

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/000694

International filing date: 21 January 2005 (21.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: ES
Number: P200400121
Filing date: 21 January 2004 (21.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 03 June 2005 (03.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

CERTIFICADO OFICIAL

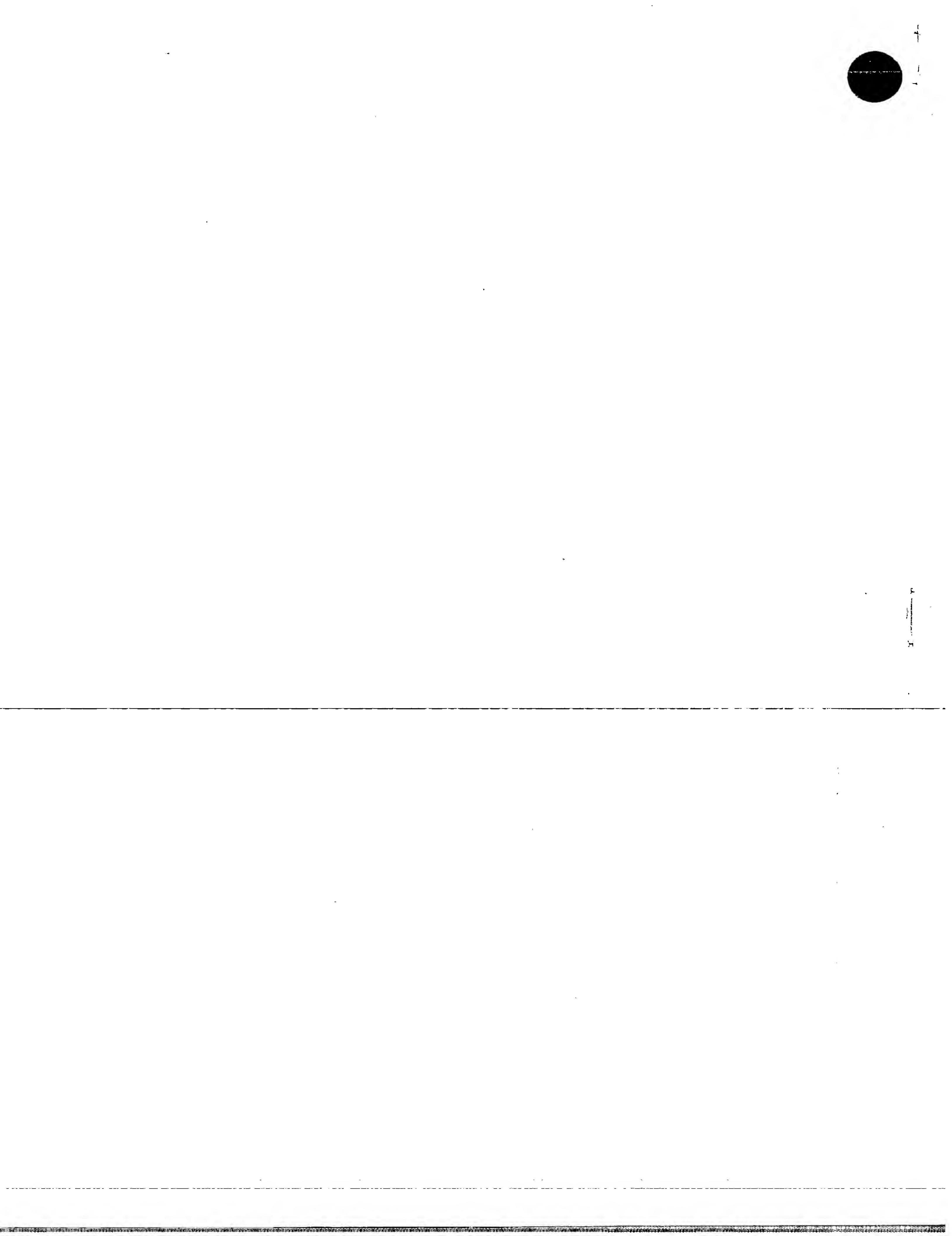
Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE DE INVENCIÓN número 200400121 , que tiene fecha de presentación en este Organismo el 21 de Enero de 2004.

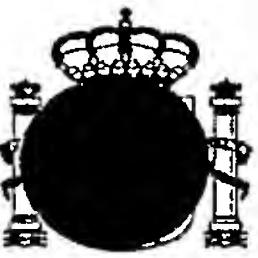
Madrid, 10 de Febrero de 2005

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica

P.D.

ANA M^a REDONDO MÍNGUEZ





MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

INSTANCIA DE SOLICITUD

NUMERO DE SOLICITUD

P200400121

4 ENE 21 11:26

(1) MODALIDAD:

PATENTE DE INVENCIÓN

MODELO DE UTILIDAD

(2) TIPO DE SOLICITUD:

- ADICIÓN A LA PATENTE
- SOLICITUD DIVISIONAL
- CAMBIO DE MODALIDAD
- TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA
- PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:

MODALIDAD
Nº SOLICITUD
FECHA SOLICITUD

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN: CÓDIGO
MADRID 28

(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL

CONSEJO SUP. INVESTIG. CIENTÍFICAS
BIONOSTRA, S.L.

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO PAÍS

DNI/CIF

CNAE PYME

ESPAÑOLA

ES

Q2818002D

ESPAÑOLA

ES

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO SERRANO, 117

LOCALIDAD MADRID

PROVINCIA MADRID

PAÍS RESIDENCIA ESPAÑA

NACIONALIDAD ESPAÑOLA

TELÉFONO 91 5855000

FAX 91 5855287

CORREO ELECTRÓNICO ott@csic.es

CÓDIGO POSTAL 28006

CÓDIGO PAÍS ES

CÓDIGO PAÍS ES

(7) INVENTOR (ES):

RODRÍGUEZ AGUIRRE
RUIZ CASTÓN
GONZÁLEZ DE LLANO

APELLIDOS

NOMBRE
JOSE FCO
JOSÉ
Mª DOLORES

NACIONALIDAD

ESPAÑOLA
ESPAÑOLA
ESPAÑOLA

CÓDIGO
PAÍS
ES
ES
ES

(8)

EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

INVENC. LABORAL

CONTRATO

SUCESIÓN

(10) TÍTULO DE LA INVENCION:

CÁPSIDAS VACÍAS (VLPs(-VP4)) DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA: SI NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:
PAÍS DE ORIGEN CÓDIGO PAÍS NÚMERO FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

(15) AGENTE /REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLÉNESE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

- DESCRIPCIÓN Nº DE PÁGINAS:
- DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN
- Nº DE REIVINDICACIONES:
- JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD
- DIBUJOS. Nº DE PÁGINAS:
- HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA
- LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PÁGINAS:
- PRUEBAS DE LOS DIBUJOS
- RESUMEN
- CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN
- DOCUMENTO DE PRIORIDAD
- OTROS: AUTORIZACIÓN
- TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

(VER COMUNICACIÓN)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

P200400121

FECHA DE PRESENTACIÓN

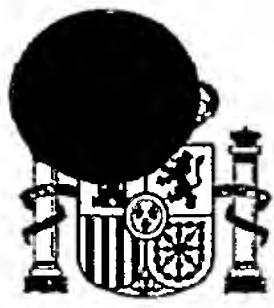
RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

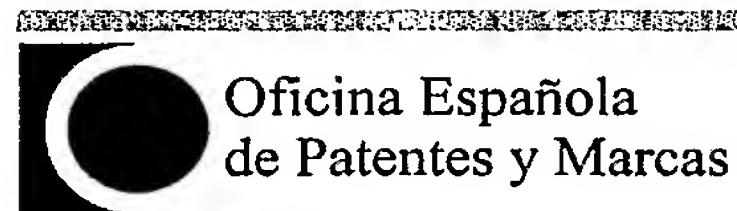
CÁPSIDAS VACÍAS (VLPs(-VP4)) DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES

Las cápsidas vacías del virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV), VLP(-VP4), se caracterizan porque están constituidas, únicamente, por ensamblaje de proteínas pVP2 de IBDV y proteínas VP3 de IBDV. Dichas cápsidas tienen actividad inmunogénica y pueden ser utilizadas en la elaboración de vacunas para proteger animales de la infección causada por IBDV así como en la elaboración de vectores para terapia génica.

GRÁFICO



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



HOJA DE INFORMACION COMPLEMENTARIA

NÚMERO DE SOLICITUD

P200400121

FECHA DE PRESENTACIÓN

PATENTE DE INVENCIÓN

MODELO DE UTILIDAD

(5) SOLICITANTES:	APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL	NOMBRE	NACIONALIDAD	CÓDIGO PAÍS	DNI/CIF	CNAE	PYME

(7) INVENTORES:	APELLIDOS	NOMBRE	NACIONALIDAD
OÑA BLANCO		ANA M*	ESPAÑOLA
ABAITU ELUSTONDO		FERNANDO	ESPAÑOLA
LUQUE BUZO		DANIEL	ESPAÑOLA
RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ-ALBA		JUAN RAMÓN	ESPAÑOLA

MOD. 3102i - 2 - EJEMPLAR PARA EL SOLICITANTE

(12) EXPOSICIONES OFICIALES:	LUGAR	FECHA
(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	CÓDIGO PAÍS	NÚMERO
PAÍS DE ORIGEN		



(12)

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

(21) NÚMERO DE SOLICITUD

(31) NÚMERO

DATOS DE PRIORIDAD

(32) FECHA

(33) PAÍS

(22) FECHA DE PRESENTACIÓN

(71) SOLICITANTE (S)

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
BIONOSTRA, S.L.

DOMICILIO SERRANO, 117 - 28006 MADRID

NACIONALIDAD **ESPAÑOLA**

(62) PATENTE DE LA QUE ES
DIVISORIA

(72) INVENTOR (ES) José Francisco Rodríguez Aguirre, José Ruiz Castón, M^a Dolores González de Llano, Ana M^a Oña Blanco, Fernando Abaitua Elustondo, Daniel Luque Buzo y Juan Ramón Rodríguez Fernández-Alba

(51) Int. Cl.

GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

(54) TÍTULO DE LA INVENCIÓN

**CÁPSIDAS VACÍAS (VLPs(-VP4)) DEL VIRUS CAUSANTE DE LA
ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU
PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES**

(57) RESUMEN

**CCÁPSIDAS VACÍAS (VLPs(-VP4)) DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV),
SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES**

Las cápsidas vacías del virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV), VLP(-VP4), se caracterizan porque están constituidas, únicamente, por ensamblaje de proteínas pVP2 de IBDV y proteínas VP3 de IBDV. Dichas cápsidas tienen actividad inmunogénica y pueden ser utilizadas en la elaboración de vacunas para proteger animales de la infección causada por IBDV así como en la elaboración de vectores para terapia génica

CÁPSIDAS VACÍAS (VLPs(-VP4)) DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a cápsidas virales vacías del virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV), con actividad inmunogénica frente a IBDV, constituidas por las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, a su producción mediante ingeniería genética y a sus aplicaciones, en particular, en la elaboración de vacunas frente a la enfermedad aviar 10 denominada bursitis infecciosa causada por IBDV y en la elaboración de vectores para terapia génica.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), también 15 conocida como enfermedad de Gumboro, pertenece a la familia Birnaviridae, infecta distintas especies aviares y es el responsable directo de una grave enfermedad inmunosupresora causante de importantes pérdidas económicas en la industria avícola mundial.

Las partículas de IBDV son icosaédricas, con una simetría T=13, carecen de 20 envuelta y están formadas por una única capa proteica. Hasta el momento, las aproximaciones encaminadas a la obtención un modelo atómico para las partículas de IBDV han fracasado. Por ello, la información estructural disponible está basada en modelos tridimensionales generados a partir de imágenes obtenidas por criomicroscopía electrónica del virus purificado y de VLPs. En base a esos estudios, se ha comprobado 25 que la superficie externa de la partícula está formada por un entramado continuo de 260 trímeros de la proteína VP2 (37 kDa) ordenados en cinco conformaciones diferentes. La cara interna de las partículas contiene 200 trímeros de la proteína VP3 (29 kDa), estos últimos, independientes entre sí, se encuentran unidos a la zona basal de los trímeros de VP2. Se ha sugerido que un tercer polipéptido, VP4 (28 kDa), también podría formar 30 parte de las partículas, estando situado en la base de los pentámeros que forman los vértices de la estructura icosaédrica.

Los polipéptidos VP2, VP3 y VP4 se producen a partir del procesamiento proteolítico de un polipéptido precursor de un tamaño de 109 kDa. Este precursor se

procesa auto-catalíticamente liberando los polipéptidos pVP2 (48 kDa), VP3 y VP4. El dominio VP4, que se localiza en la región central de la poliproteína, pertenece a la familia de las proteasas Lon y es el responsable del corte proteolítico. Los polipéptidos pVP2 y VP3 son los responsables directos del ensamblaje de las cápsidas. El producto 5 pVP2 sufre un último corte en su extremo C-terminal antes de dar lugar a la forma madura de la proteína, VP2, que es la que se encuentra en las partículas purificadas (Da Costa, B., Chevalier, C., Henry, C., Huet, J. C., Petit, S., Lepault, J., Boot, H. & Delmas, B. (2002). The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *Journal of Virology* 76:2393-10 2402). Este procesamiento de pVP2 es necesario para la correcta formación de las cápsidas y requiere de la presencia de VP3, aunque la proteasa responsable aún no ha sido identificada (Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Diaz-Ruiz, A., Caston, J. R., Pazos, F. & Rodríguez, J. F. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical 15 role for capsid formation. *Journal of Virology* 77:6438-49).

Las vacunas convecionales empleadas para el control de la bursitis infecciosa se basan en el empleo de cepas, con diferentes grados de virulencia, del propio IBDV crecidas en cultivo celular o en huevos embrionados. Los extractos que contienen el material infeccioso son sometidos a procesos de inactivación química para producir 20 vacunas inactivadas o bien son empleados de forma directa para producir vacunas vivas atenuadas (Sharma, J. M., Kim, I. J., Rautenschlein, S. & Yeh, H. Y. (2000). Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Developmental and Comparative Immunology* 24:223-235; van den Berg TP, Eterrado N, Toquin D, Meulemans G. 2000. Rev Sci Tech 2000, 19:509-543). Este último tipo de vacunas 25 presenta los inconvenientes clásicos asociados con el empleo de vacunas vivas atenuadas, concretamente, el riesgo de mutaciones que reviertan la virulencia del virus o le hagan perder su inmunogenicidad.

Se han descrito vacunas sub-unidad recombinantes que contienen la proteína VP2 de IBDV expresada en diversos sistemas de expresión, por ejemplo, bacterias, 30 levaduras o baculovirus, normalmente en forma de proteína de fusión. Los resultados obtenidos en ensayos de inmunización de pollos con dichas vacunas no han sido completamente satisfactorios.

Las cápsidas virales vacías o partículas pseudovirales (VLPs, del inglés “virus-like particles”), constituyen una alternativa al empleo de vacunas vivas atenuadas y de vacunas sub-unidad recombinantes. Las VLPs se obtienen por autoensamblaje de las sub-unidades constituyentes de la cápsida viral y mimetizan la estructura y propiedades 5 antigenicas del virión nativo aunque carecen de material genético por lo que son incapaces de replicarse. Además de su aplicación con fines vacunales las VLPs pueden ser utilizadas como vectores de moléculas de interés biológico, por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos o proteínas. A modo ilustrativo pueden citarse VLPs de parvovirus (US 6.458.362) o del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (US 6.602.705).

10 La morfogénesis es un proceso vital para el ciclo vírico que requiere de pasos sucesivos asociados a modificaciones en los polipéptidos precursores. Por ello, los virus han desarrollado estrategias que permiten la secuencial y correcta interacción entre cada uno de sus componentes. Una de estas estrategias, utilizada con frecuencia por virus icosaédricos, es la utilización de polipéptidos provenientes de una única poliproteína 15 como base de sus componentes estructurales. En estos casos, el adecuado procesamiento proteolítico de dicha poliproteína juega un papel crucial en el proceso de ensamblaje.

En trabajos previos se ha demostrado este principio para el ensamblaje de las cápsidas de IBDV (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus 20 infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). La expresión en células eucarióticas del gen codificador para la poliproteína de IBDV da lugar a la formación de VLPs totalmente indistinguibles morfológica y bioquímicamente de los viriones de IBDV. Asimismo, se ha comprobado que el ensamblaje de las cápsidas necesita únicamente de la síntesis y 25 del correcto procesamiento de la poliproteína viral y es independiente de la presencia del genoma vírico o de otras proteínas codificadas por el genoma viral tales como VP5 y VP1.

Paralelamente a la formación de cápsidas, el producto VP4 de IBDV es capaz de autoensamblarse en estructuras tubulares de 20 nm de diámetro. Estos túbulos, 30 conocidos como túbulos de tipo II, se co-purifican parcialmente con las partículas virales. Otros experimentos han demostrado que la obtención de VLPs de IBDV, utilizando para la expresión de la poliproteína baculovirus recombinantes (rBVs), es extremadamente ineficiente obteniéndose como resultado la acumulación de grandes

cantidades de túbulos de tipo I en el citosol de las células infectadas (Martínez-Torrecuadrada, J. L., Castón, J. R., Castro, M., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. & Casal, J. I. (2000). Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* 278:322-331; Chevalier, C., 5 Lepault, J., Erk, I., Da Costa, B. & Delmas, B. (2002). The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *Journal of Virology* 76:2384-2392). Recientemente se ha demostrado que esto es debido al corte proteolítico a que es sometida la proteína VP3 cuando es sintetizada en células de insecto. Dicha proteólisis se previene casi totalmente por la formación de complejos VP3/VP1 10 (Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Diaz-Ruiz, A., Caston, J. R., Pazos, F. & Rodríguez, J. F. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role for capsid formation. *Journal of Virology* 77:6438-6449).

Por tanto, los resultados obtenidos hasta la fecha a partir de la expresión de los 15 genes de IBDV en distintos sistemas recombinantes ha permitido concluir que: (i) el proceso de ensamblaje es independiente de la presencia del material genético del virus, (ii) para el ensamblaje sólo son necesarios los polipéptidos codificados por el gen de la poliproteína, y (iii) el ensamblaje requiere de una interacción coordinada entre los péptidos pVP2 y VP3.

20 Sin embargo, no se conoce si la interacción pVP2/VP3 se establece entre dominios de VP2 y VP3 de la poliproteína precursora cuando aún no ha sufrido modificaciones, o si por el contrario, esta interacción ocurre tras el procesamiento del precursor. Además, la información actual no excluye la posibilidad de que VP4 pudiera jugar un papel relevante en la morfogénesis de la cápsida viral. De hecho, se han descrito VLPs de IBDV formadas por ensamblaje de las proteínas VP2, VP3 y VP4 de 25 IBDV (US 6.528.063, US 5.788.970 y JP 5194597).

Por otro lado, la información acerca de la expresión de proteínas de IBDV mediante ingeniería genética en distintos modelos celulares es escasa. Se ha descrito la expresión de proteínas de IBDV en células de insecto, bacterias y levaduras. Jagadish et 30 al. (Jagadish MN, Vaughan PR, Irving RA, Azad AA, Macreadie IG. (1990). Expression and characterization of infectious bursal disease virus polyprotein in yeast. Gene 9:179-186; Macreadie IG, Vaughan PR, Chapman AJ, McKern NM, Jagadish MN, Heine HG, Ward CW, Fahey KJ, Azad AA. (1990). Passive protection against

infectious bursal disease virus by viral VP2 expressed in yeast. Vaccine 8:549-552) describen la expresión de VP2 de IBDV en levaduras. Los resultados descritos indican que la expresión de la poliproteína viral en 2 especies de levadura, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pombe*, es muy ineficiente, acumulándose una gran variedad de productos proteicos de diferente masa molecular. El fracaso en la obtención de productos proteicos del tamaño esperado y la imposibilidad de detectar estructuras producidas por el ensamblaje de éstas fue atribuido a dos posibles causas: (i) una posible toxicidad de la proteasa de IBDV (VP4) en este sistema; y/o (ii) la ineficiencia del sistema de expresión para llevar a cabo una transcripción y/o traducción correcta de la poliproteína de IBDV. Recientemente, Pitcovski et al. (Pitcovski J., Gutter B, Gallili G, Goldway M, Perelman B, Gross G, Krispel S, Barbakov M, Michael A. (2003). Vaccine 21:4736-4743) han descrito la expresión de VP2 de IBDV en *Pichia pastoris* y la inmunización de pollos con un material que comprende la proteína recombinante (rVP2) en forma parcialmente purificada. En ningún caso se ha descrito la obtención en levaduras de VLPs de IBDV.

Un trabajo previo desarrollado por los inventores ha permitido establecer sistemas para la obtención de VLPs de IBDV empleando diferentes vectores de expresión eucariótica. Estos vectores han sido utilizados para la expresión de la poliproteína de IBDV en ausencia o presencia de la RNA polimerasa viral VP1. La caracterización bioquímica de las VLPs purificadas demuestra que contienen las proteínas pVP2, VP2 y VP3, cuando se expresa únicamente la poliproteína viral y las proteínas pVP2, VP2, VP3 y VP1 cuando se realiza la expresión simultánea de la poliproteína y la RNA polimerasa viral (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79: 1047-1054; Martínez-Torrecuadrada, J. L., Castón, J. R., Castro, M., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. & Casal, J. I. (2000). Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* 278: 322-331; Maraver, A., et al., (2003) citado supra; Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal*

of Virology 73: 6973-6983). Sin embargo, no se han descrito previamente VLPs basadas únicamente en pVP2 y VP3 de IBDV, ni su potencial uso con fines vacunales o como vehiculizadoras de productos biológicos de interés.

5 COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La invención se enfrenta con el problema de proporcionar nuevas vacunas eficaces y seguras frente al virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV).

La solución proporcionada por esta invención se basa en que es posible obtener VLPs de IBDV correctamente ensambladas mediante la expresión simultánea de los polipéptidos pVP2 y VP3 de IBDV como genes independientes y como única representación de las proteínas de IBDV en un sistema de expresión génica. Dichas VLPs están formadas por autoensamblaje de, únicamente, pVP2 y VP3 de IBDV, por lo que carecen de VP4 de IBDV, y, por ese motivo, se denominan VLP(-VP4) (singular) o VLPs(-VP4) (plural) en esta descripción. Dichas VLPs(-VP4) pueden ser utilizadas, por ejemplo, con fines terapéuticos o de diagnóstico, por ejemplo, en la elaboración de vacunas para proteger aves de la infección causada por IBDV o en la elaboración de vectores para terapia génica.

Los resultados obtenidos permiten concebir dos nuevas conclusiones al entendimiento del patrón de ensamblaje del IBDV: (i) las interacciones entre los polipéptidos pVP2/VP3 dan como resultado un ensamblaje eficiente de las partículas de IBDV sin necesidad de la expresión de la poliproteína completa, y (ii) el polipéptido VP4 no es necesario para la formación de la cápsida.

Estos resultados han permitido diseñar una nueva estrategia o procedimiento para la producción eficiente de VLPs de IBDV que contienen los elementos proteicos antigenicamente relevantes para inducir una respuesta inmune. Esta estrategia se basa en la utilización de un sistema o vector de expresión génica que permite la coexpresión de los polipéptidos pVP2 y VP3 como genes independientes y que evita la síntesis de la poliproteína precursora de dichos polipéptidos así como la presencia del polipéptido VP4 durante el proceso de ensamblaje de las cápsidas virales vacías.

En una realización particular, se describe la expresión y obtención de VLPs de IBDV, en particular, VLPs(-VP4), en células de insecto mientras que en otra realización particular dichas VLPs(-VP4) se obtienen en levaduras, con un rendimiento muy elevado y con un coste económico muy bajo.

Las vacunas obtenidas utilizando dichas VLPs(-VP4) presentan numerosas ventajas ya que, por una parte, se evita la manipulación de material altamente infeccioso, se previene el riesgo potencial de aparición de nuevos mutantes de IBDV y se elimina el uso de virus vivo en las explotaciones avícolas, previniéndose de este modo el riesgo de diseminación de cepas vacunales de IBDV al Medio Ambiente, y, por otra parte, permite el desarrollo de sistemas de diagnóstico diferencial para discriminar entre animales vacunados e infectados. Estos sistemas de diagnóstico se basan en la detección de anticuerpos frente a las proteínas VP2 y VP4. Los animales con IBDV desarrollan una fuerte respuesta humoral frente a ambas proteínas. Mientras que los animales inmunizados con VLPs(-VP4) solo presentan anticuerpos frente a la proteína VP2.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención lo constituye una cápsida viral vacía de IBDV, VLP(-VP4), con actividad inmunogénica frente a la infección en IBDV, caracterizada porque está constituida por autoensamblaje de, únicamente, las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV.

Un aspecto adicional de esta invención se relaciona con un procedimiento para la producción de dichas VLPs(-VP4) de IBDV proporcionadas por esta invención, basado en la co-expresión génica de dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV como dos genes independientes.

Los ácidos nucleicos, construcciones génicas, sistemas de expresión y células huésped desarrollados para la puesta en práctica de dicho procedimiento de producción de dichas VLPs(-VP4) de IBDV, así como su empleo para la producción de dichas VLPs(-VP4) de IBDV, constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

Dichas VLPs(-VP4) de IBDV tienen la capacidad de inmunizar animales, en particular, aves, frente a la enfermedad aviar causada por el IBDV así como la capacidad de vectorizar o vehiculizar moléculas de interés biológico, por ejemplo, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. En una realización particular, dichas VLPs(-VP4) de IBDV pueden ser utilizadas en la elaboración de una vacuna para proteger aves frente al virus causante de la enfermedad aviar conocida como bursitis infecciosa (IBDV). Prácticamente cualquier ave, preferentemente aquellas especies aviares de interés económico, por ejemplo, pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices, avestruces, etc., pueden ser inmunizadas frente a la infección causada por IBDV con las vacunas proporcionadas por esta invención. En otra realización particular,

dichas VLPs(-VP4) de IBDV pueden vehiculizar, en su interior, productos con actividad biológica, por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, fármacos, etc., por lo que pueden ser utilizadas en la elaboración de vectores para terapia génica.

Por tanto, en otro aspecto adicional, la presente invención se relaciona con el empleo de dichas VLPs(-VP4) de IBDV, en la elaboración de medicamentos, tales como vacunas y vectores para terapia génica. Dichas vacunas y vectores constituyen aspectos adicionales de la presente invención. En una realización particular, dicha vacuna es una vacuna útil para proteger aves de la infección causada por IBDV. En una realización concreta, dichas aves seleccionan del grupo formado por pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices y avestruces, preferentemente, pollos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. (a) El diagrama esquematiza los pasos de procesamiento proteolítico necesarios para la formación de las proteínas maduras de la cápsida VP2 y VP3 a partir de la poliproteína precursora. (b) El diagrama refleja las diferentes construcciones genéticas derivadas de la poliproteína de IBDV descritas hasta el momento, así como las estructuras producidas mediante su expresión en diferentes sistemas heterólogos. Los números indican la posición correspondiente al primer y último residuo aminoacídico de la poliproteína presente en cada una de las construcciones. La parte inferior de la figura muestra imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de las estructuras obtenidas mediante expresión de las diferentes construcciones. La barra corresponde a 50 nm. Los datos han sido tomados de las siguientes referencias: Fernández-Arias *et al.*, (1998), citado *supra*; Maraver *et al.*, (2003), citado *supra*; Martínez-Torrecuadrada *et al.*, (2000), citado *supra*; Castón *et al.*, 2001. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the t number for capsid assembly. *Journal of Virology* 75, 10815-10828.

Figura 2. Análisis microscópico de células de insecto H5 que coexpresan pVP2 y VP3. La distribución subcelular de las proteínas pVP2 y VP3 fue analizada mediante inmunomicroscopía confocal. Células infectadas con los rBVs FB/pVP2 (a), FB/VP3 (b), o FBD/pVP2-VP3 (c-e) fueron incubadas con suero de conejo anti-pVP2 y suero de rata anti-VP3. A continuación, las células fueron incubadas con suero de cabra anti-Ig de conejo acoplada a Alexa 488 (rojo) y con suero de cabra anti-Ig de rata

acoplada a Alexa 594 (verde). Los núcleos se tiñeron con To-Pro 3 (azul). (e) Superposición de las imágenes mostradas en los paneles (c) y (d). Imágenes de microscopía electrónica correspondientes a secciones de células H5 infectadas con diferentes construcciones genéticas derivadas de la poliproteína de IBDV. (f) Imagen a baja magnificación de una célula H5 infectada con virus FB parental. El inserto corresponde a un detalle ampliado del área indicada por el recuadro. (g) Imagen a baja magnificación de una célula H5 infectada con el virus FBD/pVP2-VP3. El inserto corresponde a un detalle ampliado del área indicada por el recuadro. (h) Imagen de alta magnificación de una célula H5 infectada con el virus FBD/pVP2-VP3 que muestra en detalle la formación de estructuras de IBDV. (i) Imagen de alta magnificación de una célula BSC1 infectada con el virus vacunal recombinante VTLacOI/POLY mostrando estructuras similares a las detectadas en el panel (h). Las barras indican 600 nm (paneles f y g) y 200 nm (paneles h e i).

Figura 3. Caracterización estructural y bioquímica de las estructuras derivadas de IBDV producidas en células de insecto co-infectadas con los baculovirus recombinantes (rBV) FB/pVP2 + FB/his-VP3. Células co-infectadas con los rBV FB/pVP2 y FB/his-VP3, o infectadas con el virus FBD/Poly-VP1 o FB/pVP2 fueron empleadas para purificar estructuras derivadas de IBDV mediante centrifugación en gradientes de sacarosa. Los paneles (a), (b), y (c) muestran imágenes de microscopía electrónica de transmisión correspondientes a la fracción 4 de los gradientes obtenidos a partir de las infecciones con FBD/Poly-VP1, FB/pVP2+FB/his-VP3, y FB/pVP2, respectivamente. El panel (d) muestra los resultados de un análisis mediante Western blot de los gradientes de sacarosa correspondientes a cultivos infectados con FBD/Poly-VP1 y FB/pVP2+FB/his-VP3, respectivamente. Los extractos totales (input) y las diferentes fracciones de los gradientes de sacarosa (la fracción F1 corresponde al fondo del gradiente) fueron analizadas mediante Western blot empleando sueros específicos frente a las proteínas VP1, pVP2, VP3, y VP4 de IBDV, respectivamente. Se indica la masa molecular en kDa de los polipéptidos inmunoreactivos.

Figura 4. Caracterización bioquímica y estructural de VLPs de IBDV producidas en *S. cerevisiae* transformadas con el plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP. Un cultivo de *S. cerevisiae* transformada con el plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP fue crecido a 30°C en medio suplementado con el inductor galactosa. A las 18 h el cultivo fue recogido y centrifugado. El sedimento resultante fue procesado mediante

fraccionamiento en un gradiente lineal 25-50% de sacarosa. A) Análisis bioquímico de muestras correspondientes al sedimento antes de fraccionar (T) así como de las diferentes fracciones del gradiente de sacarosa. Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE y western blot empleando anticuerpos específicos frente a las proteínas VP3 (anti-VP3) y pVP2 (anti-pVP2). Las flechas indican las posiciones de las bandas inmunoreactivas correspondientes a las proteínas VP3-GFP (61 kDa) y pVP2 (48 kDa), respectivamente. B) El análisis estructural de las muestras obtenidas fue realizado mediante TEM. La imagen corresponde a una micrografía obtenida a partir de una alícuota correspondiente a la mezcla de las fracciones 7, 8 y 9 del gradiente de sacarosa. La muestra fue teñida con acetato de uranilo y observada mediante TEM. La barra corresponde a 65 nm. C) Muestra de VLPs obtenidas mediante la expresión de la poliproteína de IBDV en células de mamífero mediante infección con el virus vacunal recombinante VT7/Poly (Fernández-Arias *et al.*, (1998), citado *supra*). La barra corresponde a 65 nm.

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

En un primer aspecto, la invención proporciona una cápsida vacía del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), en adelante VLP(-VP4) de la invención, caracterizada porque está constituida por ensamblaje de, únicamente, 20 proteínas pVP2 de IBDV y proteínas VP3 de IBDV.

El término “IBDV”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a las diferentes cepas de IBDV pertenecientes a cualquiera de los serotipos (1 ó 2) conocidos [a título ilustrativo véase la revisión realizada por van den Berg TP, Eterradossi N, Toquin D, Meulemans G., en *Rev Sci Tech* 2000 19: 509-43] y los términos “proteína pVP2 de IBDV” y “proteína VP3 de IBDV” se refieren a las diferentes formas de las proteínas pVP2 y VP3 representativas de cualquiera de las mencionadas cepas de IBDV [NCBI protein databank], de acuerdo con la definición realizada por Sánchez y Rodríguez (1999) (Sánchez AB, Rodríguez JF. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology*. 1999 Sep 15; 262(1):190-199) así como proteínas sustancialmente homólogas a dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, es decir, proteínas cuyas secuencias de aminoácidos tienen un grado de identidad, respecto a dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos

un 80%, más preferentemente de, al menos, un 90% y, aún más preferentemente de, al menos, un 95%.

La proteína pVP2 de IBDV presente en la VLP(-VP4) de la invención puede ser cualquier proteína pVP2 representativa de cualquier cepa de IBDV, por ejemplo, la proteína pVP2, longitud completa, de IBDV cepa Soroa [NCBI, número de acceso AAD30136]

La proteína de VP3 de IBDV presente en la VLP(-VP4) de la invención puede ser cualquier proteína VP3 representativa de cualquier cepa de IBDV, por ejemplo, la proteína VP3, longitud completa, de IBDV cepa Soroa [NCBI, número de acceso AAD30136].

En una realización particular, las VLPs(-VP4) de la invención presentan un diámetro de 65-70 nm y un contorno poligonal indistinguible de las VLPs de IBDV obtenidas en otros sistemas de expresión (Figura 4C).

Las VLPs(-VP4) de la invención pueden obtenerse mediante la expresión simultánea de dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, en células huésped apropiadas. Dichas células huésped apropiadas son células que contienen la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína VP3 de IBDV, bien en una única construcción génica o bien en dos construcciones génicas. En una realización particular, dichas células huésped apropiadas son células transformadas, transfectadas o infectadas con un sistema de expresión adecuado, tal como un sistema de expresión que comprende una construcción génica, en donde dicha construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína VP3 de IBDV, o bien, alternativamente, con un sistema de expresión que comprende una primera construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína pVP2 de IBDV, y una segunda construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína VP3 de IBDV.

Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV, en forma de 2 genes independientes. De forma más concreta, el ácido nucleico proporcionado por esta invención se caracteriza porque su secuencia de nucleótidos está constituida por (i) una secuencia de nucléotidos que comprende la fase

de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y (ii) una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV. Una característica del ácido nucleico proporcionado por esta invención es que carece de la secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP4 de IBDV. Tal como se utiliza en esta descripción, el término “fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2” o “fase de lectura abierta correspondiente a la proteínas VP3 de IBDV” incluye, además de las secuencias de nucleótidos de dichas fases de lectura abierta, otras fases de lectura abiertas análogas a las mismas codificantes de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV. El término “análogo/a”, tal como aquí se utiliza, pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos que puede ser aislada o construida sobre la base de la secuencia de nucleótidos codificantes de pVP2 y VP3 de IBDV, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia. En general, una secuencia de nucleótidos análoga a otra secuencia de nucleótidos es sustancialmente homóloga a dicha secuencia de nucleótidos. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de nucleótidos, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos, un 80%, más preferentemente de, al menos, un 90% y, aún más preferentemente de, al menos, un 95%.

En otro aspecto, la invención proporciona una construcción génica que comprende un ácido nucleico proporcionado por esta invención, es decir, un ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos está constituida por (i) una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y (ii) una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV. Dicha construcción génica carece de la secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP4 de IBDV.

En otro aspecto, la invención proporciona un sistema o vector de expresión seleccionado entre:

5 a) un sistema de expresión que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV; y

10 b) un sistema de expresión que comprende dos construcciones génicas, una primera construcción génica que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, y una segunda construcción génica que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.

15

En una realización particular, el sistema de expresión proporcionado por esta invención comprende una construcción génica que comprende (i) una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y (ii) una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, en donde dicha construcción génica está operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.

En otra realización particular, el sistema de expresión proporcionado por esta invención comprende (i) una primera construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha primera construcción génica una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, y (ii) una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha segunda construcción génica una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV.

Los elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, presentes en el sistema de expresión proporcionado por esta invención incluyen promotores, que dirigen la transcripción de las secuencias de nucleótidos de interés a las que están operativamente enlazados, y otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc.

Prácticamente cualquier sistema o vector de expresión apropiado puede ser utilizado en la generación del sistema de expresión proporcionado por esta invención. A modo ilustrativo, dichos sistemas o vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos, bácmidos, cromosomas artificiales de levadura (YACs), cromosomas artificiales de bacteria (BACs), cromosomas artificiales basados en el bacteriófago P1 (PACs), cósmidos, o virus, que pueden contener, además, un origen de replicación heterólogo, por ejemplo, bacteriano o de levadura para que pueda ser amplificado en bacterias o levaduras, así como un marcador utilizable para seleccionar las células transfectadas diferente al gen o genes de interés. Estos sistemas o vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory] y forman parte de la presente invención. En una realización particular, dicho sistema o vector de expresión es un plásmido, tal como un plásmido adecuado para transformar levaduras, por ejemplo, el plásmido denominado pESCURA/pVP2-VP3-GFP (Ejemplo 2), o un virus, tal como un baculovirus recombinante (rBV), por ejemplo, el rBV denominado FBD/pVP2-his-VP3 (Ejemplo 1.2), que expresa durante su ciclo de replicación ambas proteínas (pVP2 de IBDV e his-VP3) simultáneamente en células de insecto, o los rBVs denominados FB/pVP2 y FB/his-VP3 (Ejemplo 1.1) que expresan las proteínas pVP2 de IBDV e his-VP3, respectivamente, cuando co-infectan células de insecto, obteniéndose VLPs(-VP4) de IBDV.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped que contiene la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína VP3 de IBDV, bien en una única construcción

génica o bien en dos construcciones génicas diferentes. En una realización particular, dicha célula huésped es una célula huésped transformada, transfectada o infectada con (i) un sistema de expresión proporcionado por esta invención que comprende bien una construcción génica, en donde dicha construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV, o bien, alternativamente, con (ii) un sistema de expresión que comprende una construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y otra construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV.

En una realización particular, la célula huésped proporcionada por esta invención es una célula huésped transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión que comprende una construcción génica que comprende (i) una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y (ii) una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, en donde dicha construcción génica está operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.

En otra realización particular, la célula huésped proporcionada por esta invención es una célula huésped transformada, transfectada o infectada con una primera construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha primera construcción génica una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, y con una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha segunda construcción génica una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV.

Prácticamente cualquier célula huésped susceptible de ser transformada, transfectada o infectada por un sistema de expresión proporcionado por esta invención puede ser utilizada, por ejemplo, células de mamífero, células aviares, células de insecto, levaduras, etc.; no obstante, en una realización particular, dicha célula huésped se selecciona entre levaduras y células de insecto. Las levaduras son adecuadas por razones

de simplicidad y coste de producción. Las células de insecto son adecuadas cuando el sistema de expresión comprende uno o dos baculovirus recombinantes (rBV). El empleo de rBV es ventajoso por cuestiones de bioseguridad relacionadas con el rango de huésped de los baculovirus, incapaces de replicar en otros tipos celulares que no sean de insecto.

5 En una realización particular, la invención proporciona una célula huésped, tal como una levadura, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, etc., transformada con un sistema de expresión, tal como un plásmido o un vector de expresión, que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y la secuencia 10 de nucleótidos que codifica para la proteína VP3 de IBDV.

En otra realización particular, la invención proporciona una célula huésped, tal como una célula de insecto, infectada con un sistema de expresión, tal como un baculovirus recombinante, que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha 15 proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína VP3 de IBDV.

En otra realización particular, la invención proporciona una célula huésped, tal como una célula de insecto, co-infectada con un sistema de expresión que comprende un primer baculovirus recombinante que comprende una construcción génica proporcionada 20 por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y con un segundo baculovirus recombinante que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína VP3 de IBDV.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la producción de VLPs(-VP4) de la invención que comprende cultivar una célula huésped proporcionada por esta invención que contiene la secuencia de nucleótidos codificantes de dicha proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos codificante de dicha proteína VP3 de IBDV, bien en una única construcción génica o bien en dos construcciones génicas diferentes, y que expresa simultáneamente dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, y, si se desea, 30 recuperar dichas VLPs(-VP4) de la invención. En una realización particular, dicha célula huésped proporcionada por esta invención es una célula transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión adecuado, tal como un sistema de expresión que comprende una construcción génica, en donde dicha construcción génica comprende la

secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV, o bien, alternativamente, con un sistema de expresión que comprende una primera construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y 5 una segunda construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV.

Dicho procedimiento comprende, por tanto, la co-expresión génica de dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV como dos genes independientes. Tras la expresión simultánea de dichas proteínas (pVP2 y VP3 de IBDV) en dichas células, las proteínas 10 expresadas se ensamblan y forman las VLPs(-VP4) de la invención, las cuales pueden ser aisladas o retiradas del medio, y, si se desea, purificadas. El aislamiento y purificación de dichas VLPs(-VP4) de la invención puede realizarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante fraccionamiento en gradientes de sacarosa.

En una realización particular, la co-expresión génica de las proteínas pVP2 y VP3 15 de IBDV se realiza mediante el empleo de un rBV que permite la expresión simultánea de dichas proteínas a partir de dos genes quiméricos independientes en células de insecto. En este caso, la producción de VLPs(-VP4) de la invención puede realizarse mediante un procedimiento que comprende, en primer lugar, la obtención de un sistema de expresión 20 génica constituido por un rBV que contiene una construcción génica que codifica simultáneamente para dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, tal como el rBV denominado FBD/pVP2-his-VP3 (Ejemplo 1.2) o bien, alternativamente, la obtención de un rBV que contiene una construcción genica que codifica para la proteína pVP2 de IBDV y la obtención de otro rBV que contiene una construcción génica que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV, tales como los rBVs denominados FB/pPV2 y FB/his-VP3 25 (Ejemplo 1.1), seguido de la infección de células de insecto con dicho sistema de expresión basado en dicho(s) baculovirus recombinante(s), expresión de las proteínas recombinantes y, si se desea, aislamiento de las VLPs(-VP4) de la invención formadas por ensamblaje de dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, y, opcionalmente, purificación posterior de dichas VLPs(-VP4) de la invención.

30 La construcción de un baculovirus recombinante que permite la expresión de forma independiente de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV se puede realizar por cualquier experto en la materia en base a lo aquí descrito y al estado de la técnica sobre esta tecnología (Cold Spring Harbor, N.Y.; Leusch MS, Lee SC, Olins PO. 1995. A novel

host-vector system for direct selection of recombinant baculoviruses (bacmids) in *Escherichia coli*. Gene 160: 191-4; Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. J Virol 67: 4566-79).

En otra realización particular, la co-expresión génica de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV se realiza mediante el empleo de un vector que permite la expresión de dichas proteínas en células de levadura. En este caso, la producción de VLPs(-VP4) de la invención puede llevarse a cabo mediante un procedimiento que comprende, en primer lugar, la obtención de un sistema de expresión génica constituido por un plásmido que contiene una construcción génica que codifica simultáneamente para las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, seguido de la transformación de levaduras con dicho sistema de expresión, expresión de las proteínas recombinantes y, si se desea, aislamiento de las VLPs(-VP4) de la invención formadas por ensamblaje de dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, y, opcionalmente, purificación posterior de dichas VLPs(-VP4) de la invención. En una realización concreta, el sistema de expresión adecuado para transformar levaduras está basado en un sistema de expresión pESC Yeast (Stratagene) tal como, por ejemplo, el plásmido pESCURA/pVP2/VP3-GFP (Ejemplo 2) que contiene una construcción génica que codifica para las proteínas pVP2 de IBDV y VP3-GFP.

La obtención de levaduras transformadas con una construcción génica o con un sistema o vector de expresión apropiado que permite la expresión simultánea de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV se puede realizar por cualquier experto en la materia en base a lo aquí descrito y al estado de la técnica sobre esta tecnología (pESC epitope tagging vectors Instructions manual. Stratagene www.stratagene.com; Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory).

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo del sistema de expresión génica proporcionado por esta invención para la producción y obtención de VLPs(-VP4) de la invención.

Las VLPs(-VP4) de la invención pueden ser utilizadas para inmunizar animales, en particular, aves, *per se* o como vectores o vehiculizadores de moléculas con actividad biológica, por ejemplo, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, fármacos, etc., por lo que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o de diagnóstico. En una realización

particular, dichas moléculas con actividad biológica incluyen antígenos o inductores de respuestas inmune en animales o humanos a los que se suministre, o bien fármacos que se liberan en su sitio de acción específico, o bien secuencias de ácido nucleico, todas ellas útiles en terapia génica y destinadas a ser introducidas en el interior de las células apropiadas.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de las VLPs(-VP4) de la invención en la elaboración de medicamentos tales como, vacunas, vectores para terapia génica (delivery systems), etc. En una realización particular, dicho medicamento es una vacuna destinada a conferir protección a animales, en particular, aves, frente al virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV). En otra realización particular, dicho medicamento es un vector para terapia génica.

En otro aspecto, la invención proporciona una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de VLPs(-VP4) de la invención, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Dicha vacuna es útil para proteger animales, en particular, aves, frente al virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV). En una realización particular, dichas aves se seleccionan del grupo formado por pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices y avestruces. En una realización preferida, la vacuna proporcionada por esta invención es una vacuna útil para proteger pollos de la infección causada por IBDV.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de VLPs(-VP4) de la invención calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de las VLPs(-VP4) y el efecto de inmunización a conseguir.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas vacunas son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de vacunas.

En una realización particular, dicha vacuna se prepara en forma de una solución o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier otro diluyente farmacéuticamente aceptable.

La vacuna proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada que dé como resultado una respuesta inmune protectora frente a la secuencia heteróloga o epítopo utilizado, para lo cual dicha vacuna se formulará

en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la vacuna proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por ejemplo, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados en
5 sentido limitativo de la misma.

EJEMPLO 1

Obtención de VLPs(-VP4) mediante la coexpresión de pVP2 (pVPX) y VP3 en células de insecto

10 1.1 Obtención de VLPs(-VP4) mediante la coexpresión de pVP2 (pVPX) y VP3 con dos rBVs independientes en células de insecto

En este ejemplo se describen los resultados de una serie de experimentos diseñados para analizar la posibilidad de obtener VLPs de IBDV a partir de una estrategia que evita la síntesis de la poliproteína de IBDV y, por tanto, la presencia de la proteasa VP4 durante el proceso de ensamblaje. El diseño experimental se basa en la coexpresión de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV a partir de dos genes quiméricos independientes. Para ello, se han utilizado dos baculovirus recombinantes (rBVs) descritos previamente, FB/his-VP3 (Kochan, G., González, D. & Rodríguez, J. F. 15 (2003). Characterization of the RNA binding activity of VP3, a major structural protein of IBDV. *Archives of Virology* 148, 723-744) y FB/VPX [también identificado como FB/pVP2 en esta descripción] (Martínez-Torrecuadrada, J. L., Castón, J. R., Castro, M., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. & Casal, J. I. (2000). Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. 20 *Virology* 278, 322-331). Estos rBVs fueron generados mediante el clonaje en vectores apropiados de los DNA complementarios (cDNAs) codificadores de las proteínas pVP2 y pVP3 de IBDV. Dichos cDNAs fueron obtenidos por RT-PCR a partir del segmento A del genoma de IBDV serotipo I cepa Soroa (número de acceso al NCBI, AAD30136). 25 El rBV FB/his-VP3 expresa una proteína VP3 químérica que en su extremo N-terminal contiene un tandem de 6 histidinas fusionadas a la secuencia de VP3 (Met754-Glu1012 de la poliproteína) denominada his-VP3. El rBV FB/pVP2 expresa la región codificadora de la proteína pVP2 (Met1-Ala512).

El análisis de la expresión de estas proteínas pVP2 y his-pVP3, bien de forma independiente o conjunta, se realizó en cultivos celulares. Para la realización de estos experimentos, se utilizaron cultivos en monocapa de células procedentes del insecto *Trichoplusia ni* (H5, Invitrogen) que fueron crecidos sobre cubreobjetos de cristal.

5 Dichos cultivos fueron infectados independientemente con FB/pVP2, FB/his-VP3, o co-infectados con ambos rBVs. La multiplicidad de infección fue de 5 unidades formadoras de placa (ufp)/célula. A las 48 horas después de la infección (hpi) las células fueron fijadas, e incubadas con sueros policlónales de conejo anti-VP2 y con sueros policlónales de rata anti-VP3 (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). Después de sucesivos lavados, los cubreobjetos fueron incubados con sueros de cabra anti-rata conjugado con Alexa 594 y con sueros de cabra anti-conejo conjugado a Alexa 488 (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.). Los núcleos celulares fueron teñidos con el marcador específico To-Pro-3 (Molecular Probes, Inc.). Finalmente, las muestras se visualizaron por epifluorescencia con un microscopio Zeiss Axiovert 200 equipado con el sistema confocal Bio Rad Radiance 2100. Las imágenes obtenidas se almacenaron utilizando el equipo de software Laser Sharp Package (Bio Rad). Como se muestra en la Figura 2a, en los 10 cultivos infectados con FB/pVP2 el suero anti-VP2 mostró una señal granular fina mezclada con estructuras tubulares ambas distribuidas en todo el citoplasma. La señal anti-VP3, detectada en las células infectadas con el rBV FB/his-VP3, se caracterizó por la presencia de acumulaciones de forma esférica alrededor del núcleo y, aparentemente, huecas. En los cultivos coinfectados con ambos rBV se detectó una notable 15 modificación en el patrón de distribución de ambas proteínas. En estas células, las señales específicas de pVP2 y VP3 se colocalizaron en acumulaciones esféricas y densas, sugiriendo que su coexpresión permitía la formación de complejos pVP2/his-VP3 (Figura 2c a la 2e).

20

25

Con la intención de caracterizar estas estructuras en mayor detalle, extractos similares, correspondientes a células infectadas con FB/pVP2+FB/hisVP3 fueron analizados por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Como control, y en paralelo, se analizaron por la misma técnica cultivos de células H5 infectadas con la cepa silvestre del virus FBD (FastBacDual, Invitrogen). Después de la infección, las 30

células fueron recogidas a las 48 h, y procesadas como se ha descrito previamente (Fernández-Arias A, Risco C, Martínez S, Albar JP & Rodríguez JF. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79:1047-1054) para su análisis en cortes ultrafinos por TEM. Como se muestra en la Figura 2, el citoplasma de las células coinfectadas contiene agregados formados por una mezcla de túbulos y estructuras similares a cápsidas (Figura 2g, 2h y 2i). Estos agregados no fueron observados en ningún caso en las muestras correspondientes a células infectadas con el virus silvestre FBD (Figura 2f). El aspecto y el tamaño de los túbulos, así como de las estructuras similares a cápsidas fue semejante a los descritos previamente en cultivos celulares infectados con VT7/Poly, un recombinante del virus vaccinia que expresa el gen de la poliproteína de IBDV (Fernández-Arias A, Risco C, Martínez S, Albar JP & Rodríguez JF. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79:1047-1054).

Para establecer de forma inequívoca que la coexpresión de pVP2 e his-VP3 permitía el ensamblaje y, por tanto, la obtención de VLPs-(VP4), se decidió purificar las partículas formadas. Para ello, se infectaron con FB/pVP2+FB/his-VP3 cultivos de células H5. 60 hpi, las células se homogeneizaron y los extractos se separaron en 20 gradienes de sacarosa tal y como se ha descrito previamente (Lombardo E, Maraver A, Castón JR, Rivera J, Fernández-Arias A, Serrano A, Carrascosa JL & Rodríguez JF. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73:6973-6983). Después de su centrifugación, los gradienes fueron fraccionados, y las distintas fracciones fueron analizadas por TEM tal como se ha descrito previamente (Lombardo E *et al.*, citado *supra*). Como control, y sujetos al mismo procedimiento, se fraccionaron gradienes correspondientes a extractos de células infectadas con el rBV FB/VPX o con el rBV FBD/Poly-VP1. El virus recombinante FBD/Poly-VP1 expresa simultáneamente la poliproteína y el polipéptido VP1. Como era predecible, la infección con FBD/Poly-VP1 tenía como resultado una eficiente producción de VLPs (Maraver A, Oña A, Abaitua F, González D, Clemente R, Diaz-Ruiz A, Castón JR, Pazos F & Rodríguez JF. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal

disease virus, plays a critical role for capsid formation. *Journal of Virology* 77:6438-49). Por otra parte, las fracciones correspondientes a las células infectadas con FB/VPX sólamente contenían túbulos de aspecto retorcido. Los gradientes correspondientes a células coinfectadas con los rBVs FB/pVP2+FB/his-VP3 contenían túbulos rígidos de tipo I en las fracciones cercanas al fondo del gradiente, y VLPs-(VP4) en las centrales y en las fracciones superiores (Figura 3b). Las VLPs-(VP4) aisladas de las células co-infectadas con rBV FB/pVP2+FB/his-VP3 tenían un diámetro de 65-70 nm, así como un contorno poligonal característico, absolutamente indistinguible de las VLPs purificadas de cultivos infectados con FBD/Poly-VP1 (Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Diaz-Ruiz, A., Caston, J. R., Pazos, F. & Rodríguez, J. F. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role for capsid formation. *Journal of Virology* 77:6438-49) o de los cultivos infectados con VT7/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054).

Con la intención de conseguir una caracterización bioquímica del material obtenido, se realizaron experimentos de western-blot en los que las distintas fracciones se enfrentaron a sueros específicos contra las proteínas VP1, pVP2, VP3 y VP4 (Fernández-Arias *et al.* 1998, Lombardo *et al.*, 2000). Como control se utilizaron extractos de células infectadas con IBDV. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3d. Como se esperaba, las bandas correspondientes a los polipéptidos VP1 y VP4 sólo fueron detectadas en muestras correspondientes a células infectadas con FBD/Poly-VP1. Los patrones correspondientes a pVP2/VP3 en muestras correspondientes a células infectadas con FBD/Poly-VP1 o coinfectadas con FB/VPX+ FB/his-VP3 fueron similares, detectándose dos bandas correspondientes a pVP2 y VP3, respectivamente.

1.2 Obtención de VLPs(-VP4) mediante la coexpresión de pVP2 (pVPX) y VP3 con un rBV en células de insecto

Además, se procedió a la construcción del plásmido pFBD/pVP2-his-VP3. El primer paso de la construcción se realizó mediante el clonaje de la región codificante de la proteína pVP2 en el vector pFBDual (Invitrogen). El fragmento de DNA correspondiente a pVP2 se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos identificados

como Oligo I (SEQ ID NO: 1) y Oligo II (SEQ ID NO: 2) empleando como molde el plásmido pVOTE.2/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). El fragmento fue purificado, sometido a digestión con los enzimas BglII y HindIII y clonado en el vector pFBDual (Invitrogen) previamente digerido con los enzimas BamHI y HindIII. El plásmido resultante se denominó pFBD/pVP2. A continuación, se obtuvo un fragmento de DNA conteniendo la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 mediante digestión del plásmido pFB/his-VP3 (Kochan et al., 2003, citado *supra*) con el enzima RsrII, tratamiento con Klenow, y posterior restricción con KpnI. Este fragmento de DNA fue purificado y clonado en el plásmido pFBD/pVP2 previamente digerido con los enzimas SmaI y KpnI. El plásmido resultante se denominó pFBD/pVP2-his-VP3 (SEQ ID NO: 3) y contiene la secuencia de nucleótidos codificante de las proteínas pVP2 e his-pVP3 (esta última está codificada por la cadena complementaria a los nucleótidos 6734-7585 de la SEQ ID NO: 3). La secuencia de aminoácidos de la proteína pVP2 y de la proteína de fusión his-VP3 (pVP2-his-VP3) codificada por la secuencia de nucleótidos contenida en dicho plásmido pFBD/pVP2-his-VP3 se muestra en la SEQ ID NO: 4.

El plásmido pFBD/pVP2-his-VP3 permite la obtención de un rBV, denominado FBD/pVP2-his-VP3, que expresa durante su ciclo de replicación ambas proteínas simultáneamente [<http://invitrogen.com/content/sfs/manuals/bevtest.pdf>].

Los resultados obtenidos con FBD/pVP2-his-VP3 son idénticos a los obtenidos mediante la coinfección con los rBVs FB/pVP2 y FD/his-VP3, obteniéndose VLPs(-VP4) de IBDV.

25

EJEMPLO 2

Obtención de VLPs(-VP4) mediante la coexpresión de pVP2 y VP3 como dos genes independientes en levaduras

Con el fin de estudiar la posibilidad de obtener VLPs(-VP4) de IBDV en cultivos de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) se generó el vector pESCURA/pVP2-VP3-GFP con el gen heterólogo GFP unido al extremo N-terminal de VP3. El primer paso en la construcción del vector se realizó mediante el clonaje de la región codificante de la proteína pVP2 de IBDV en el vector pESCURAinv. El plásmido pESCURAinv se

generó mediante digestión del vector pRS426 (Stratagene) con el enzima Pvull y religación de la mezcla de digestión. El vector resultante, pESCURAinv, contiene la región de clonaje múltiple en posición invertida con respecto a la del vector parental pRS426. El fragmento de DNA correspondiente a la proteína pVP2 se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos denominados Oligo III (SEQ ID NO: 5) y Oligo IV (SEQ ID NO: 6) empleando como molde el plásmido pVOTE.2/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). El fragmento fue purificado, sometido a digestión con los enzimas BglII y HindIII y clonado en el vector pESCURA.inv previamente digerido con los enzimas BamHI y HindIII. El plásmido resultante se denominó pESCURA/pVP2.

El plásmido pFB/VP3-GFP fue construido en dos etapas. La primera consistió en el clonaje de una fragmento de DNA, generado mediante PCR, que contiene la ORF de la proteína VP3 de IBDV carente del codón de terminación. Esta PCR se realizó utilizando los oligonucleótidos denominados Oligo V (SEQ ID NO: 7) y Oligo VI (SEQ ID NO: 8) y empleando como molde el plásmido pVOTE.2/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). El DNA resultante fue digerido con los enzimas EcoRI y BamHI y clonado en el vector pEGFP-N3 (Clontech) también digerido con los mismos enzimas. El plásmido resultante se denominó pVP3-GFP. A continuación, el plásmido pEGFP-GFP fue digerido con los enzimas EcoRI y NotI y clonado en el vector pFastBac1 (Invitrogen). El plásmido resultante se denominó pFB/VP3-GFP.

A continuación, se obtuvo un fragmento de DNA que contenía la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV fusionada a la región codificante de la proteína EGFP mediante digestión del plásmido pFB/VP3-GFP con los enzimas EcoRI y NotI. Este fragmento de DNA fue purificado y clonado en el plásmido pESCURA/pVP2 previamente digerido con los enzimas EcoRI y NotI. El plásmido resultante se denominó pESCURA/pVP2-VP3-GFP (SEQ ID NO: 9) y contiene las ORFs de las proteínas pVP2 y VP3-GFP bajo el control transcripcional de dos promotores independientes, GAL 1 y GAL 10, ambos inducibles por galactosa (la proteína pVP2 está codificada por la cadena de nucleótidos complementaria a los

nucleótidos 5862-7343 de la SEQ ID NO: 9). La secuencia de aminoácidos de la proteína pVP2 y de la proteína de fusión VP3-GFP (pVP2-VP3-GFP) codificada por la secuencia de nucleótidos contenida en dicho plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP se muestra en la SEQ ID NO: 10.

5 Posteriormente, pESCURA/pVP2-VP3-GFP se empleó para transformar un cultivo de la levadura *S. cerevisiae* haploide cepa 499 de acuerdo con un protocolo previamente descrito (Gietz, R.D. and R.A. Woods. (2002), Transformation of yeast by the Liac/SS carrier DNA/PEG method. Methods in Enzymology 350:87-96). Las levaduras transformadas con el plásmido fueron seleccionadas mediante crecimiento en 10 placas de medio SC (CSM + YNB, glucosa 2% y bacto agar) suplementadas con los aminoácidos triptófano, leucina e histidina y carentes de uracilo (-Ura). Tras una incubación de 48 h a 30°C, se seleccionó una colonia que fue empleada para la realización de los subsiguientes análisis de expresión de proteínas y formación de VLPs-(VP4).

15 El análisis de la expresión de las proteínas pVP2 y VP3 y formación de VLPs-(VP4) se realizó siguiendo un protocolo descrito previamente para la caracterización de VLPs de IBDV en otros sistemas de expresión (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054; Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73, 6973-698). La colonia seleccionada fue cultivada en 20 medio líquido CSM (-Ura) + YNB suplementado con rafinosa al 2%. El cultivo se incubó a 30°C durante 24 h. Este cultivo fue empleado para inocular, a una densidad óptica (D.O.) de 0,2, un matraz de 200 ml de medio CSM (-Ura) + YNB suplementado con el inductor galactosa al 2%. El cultivo fue mantenido a 30°C durante 18 horas (hasta 25 una D.O. entre 1,0 y 2,0). Las levaduras fueron centrifugadas a 3.000 rpm, 5 minutos a 4°C, se lavaron con agua destilada una vez, y el pellet fue resuspendido en tampón de lisis (TEN: Tris 10 mM, pH 8,0; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM) + inhibidores de proteasas 2X (Compl Roche). Para la lisis se añadió un volumen de “glass beads” (cuentas o perlas de vidrio) de un tamaño aproximado de 425-600 micrones (Sigma).

Esta mezcla fue sometida al vortex vigoroso durante 30 segundos 4 veces, con intervalos de 30 segundos, y todo ello a 4°C. Tras ello se recuperó la fracción soluble por centrifugación de la mezcla de lisis a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Esta muestra fue sometida a fraccionamiento en un gradiente de sacarosa de acuerdo con un protocolo previamente descrito (Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73, 6973-6983). Las muestras obtenidas tras el fraccionamiento así como una muestra del material de partida fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) [Current Protocols in Molecular Biology] e inmunodetección por Western blot (Figura 4A) empleando sueros anti-pVP2 y anti-VP3 [Current Protocols in Molecular Biology]. Como se muestra en la Figura 4A, el Western blot reveló la presencia de bandas, con la masa molecular predicha correspondiente a las proteínas pVP2 (48 kDa) y VP3-GFP (61 kDa), así como otras bandas inmunoreactivas de menor tamaño producidas probablemente por degradación proteolítica tanto en la muestra inicial como en las diferentes fracciones del gradiente. Estos resultados demostraron de forma fehaciente la correcta expresión de ambos polipéptidos en el cultivo de *S. cerevisiae* transformado con el plásmido pESCURA/pVP2-VP3. A continuación, las distintas fracciones del gradiente fueron analizadas mediante TEM tal como se ha descrito previamente (Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73, 6973-6983). Como se muestra en la Figura 4B, el análisis mediante TEM de las fracciones del gradiente reveló la existencia de VLPs de IBDV en la fracciones superiores del gradiente. Estas VLPs, VLPs(-VP4), presentan un diámetro de 65-70 nm y un contorno poligonal indistinguible de las VLPs de IBDV obtenidas en otros sistemas de expresión (Figura 4C).

REIVINDICACIONES

1. Una cápsida vacía del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), VLP(-VP4), caracterizada porque está constituida, únicamente, por
5 ensamblaje de proteínas pVP2 de IBDV y proteínas VP3 de IBDV.
2. Un ácido nucleico caracterizado porque su secuencia de nucleótidos está constituida por (i) una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y (ii) una secuencia de nucléotidos que
10 comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV.
3. Una construcción génica que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 2.
- 15 4. Un sistema de expresión seleccionado entre:
 - a) un sistema de expresión que comprende (i) una construcción génica que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, y (ii) una construcción génica que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción; y
20
 - b) un sistema de expresión que comprende una construcción génica según la reivindicación 3, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.
25
5. Sistema de expresión según la reivindicación 4, caracterizado porque se
30 selecciona entre plásmidos, bácmidos, cromosomas artificiales de levadura (YACs), cromosomas artificiales de bacteria (BACs), cromosomas artificiales basados en el bacteriófago P1 (PAC), cósmidos, y virus, que pueden contener, opcionalmente, un origen de replicación heterólogo.

6. Una célula huésped que contiene un ácido nucleico según la reivindicación 2, o una construcción génica según la reivindicación 3, o un sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5.

5

7. Una célula huésped transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5.

8. Célula huésped según la reivindicación 6 ó 7, caracterizada porque es una
10 célula de insecto o una levadura.

9. Un procedimiento para la producción de cápsidas vacías del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), VLPs(-VP4), según la reivindicación 1, que comprende cultivar una célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 6 a
15 8, y, si se desea, recuperar dichas cápsidas vacías de IBDV.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicha célula huésped es una célula de insecto, que comprende las etapas de:

20

a) preparar un sistema de expresión seleccionado entre:

25

- un sistema de expresión constituido por un baculovirus recombinante que contiene una construcción génica según la reivindicación 3, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción; y

30

- un sistema de expresión constituido por (i) un baculovirus recombinante que contiene una construcción génica que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, y (ii) un baculovirus recombinante que contiene una construcción génica que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV;

b) infectar células de insecto con dicho sistema de expresión preparado en la etapa a);

5 c) cultivar las células de insecto infectadas obtenidas en la etapa b) bajo condiciones que permiten la expresión de las proteínas recombinantes y su ensamblaje para formar cápsidas vacías, VLPs(-VP4), de IBDV; y

d) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, dichas cápsidas vacías, VLPs(-VP4), de IBDV.

10

11. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicha célula huésped es una levadura, que comprende las etapas de:

15 a) preparar un sistema de expresión constituido por un plásmido que contiene una construcción génica según la reivindicación 3;

b) transformar células de levadura con dicho sistema de expresión preparado en la etapa a);

20 c) cultivar las levaduras transformadas obtenidas en la etapa b) bajo condiciones que permiten la expresión de las proteínas recombinantes y su ensamblaje para formar cápsidas vacías, VLPs(-VP4), de IBDV; y

d) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, las cápsidas vacías, VLPs(-VP4), de IBDV.

25

12. Empleo de un sistema de expresión génica según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, para la producción y obtención de cápsidas vacías, VLPs(-VP4), de IBDV según la reivindicación 1.

30

13. Empleo de cápsidas vacías del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), VLPs(-VP4), según la reivindicación 1, en la elaboración de un medicamento.

14. Empleo según la reivindicación 13, en el que dicho medicamento es una vacuna frente a la enfermedad aviar denominada bursitis infecciosa.

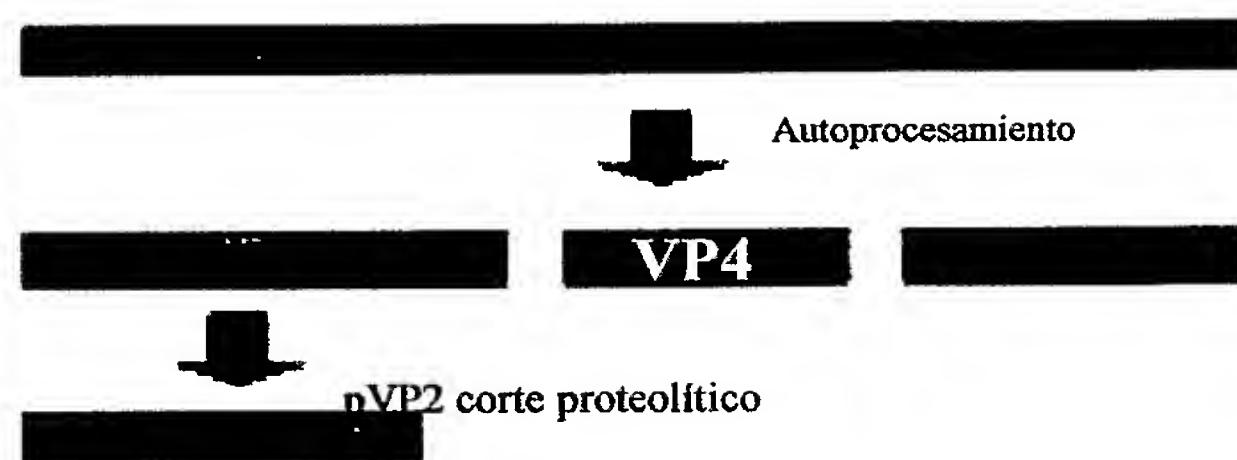
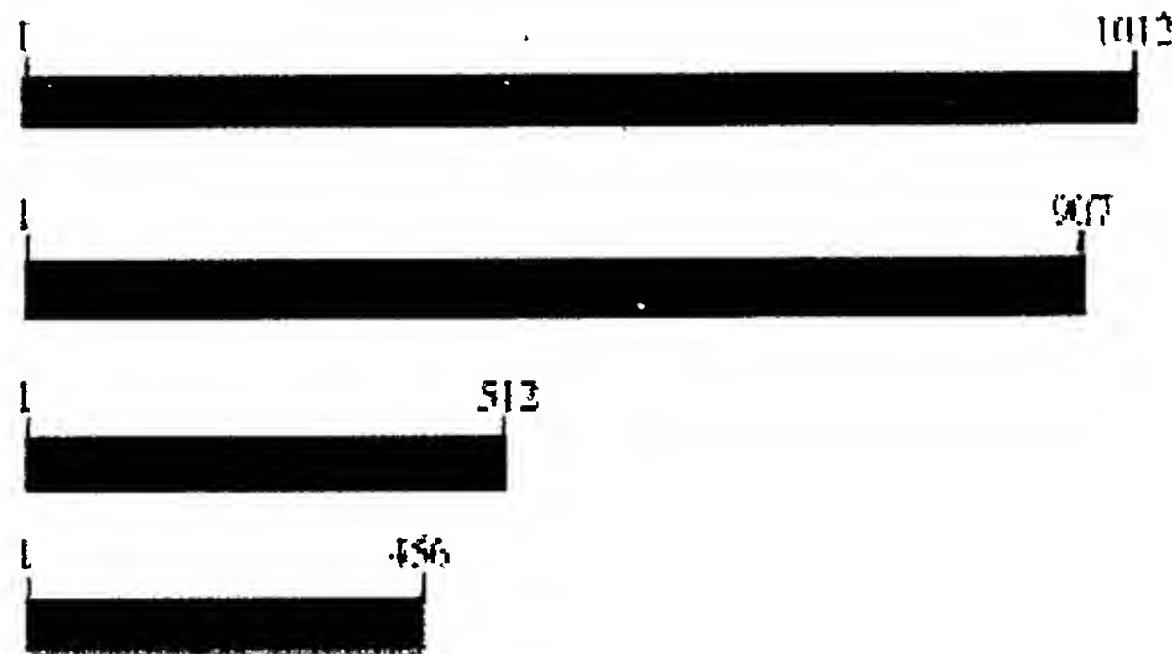
5 15. Empleo según la reivindicación 13, en el que dicho medicamento es un vector para terapia génica.

10 16. Una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de cápsidas vacías de IBDV, VLPs(-VP4), según la reivindicación 1, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

15 17. Vacuna según la reivindicación 16, para proteger aves de la infección causada por el virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV).

18. Vacuna según la reivindicación 17, en la que dichas aves se seleccionan del grupo formado por pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices y avestruces.

19. Una vacuna para proteger pollos de la infección causada por el virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV) que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de cápsidas vacías de IBDV, VLPs(-VP4), según la reivindicación 1, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

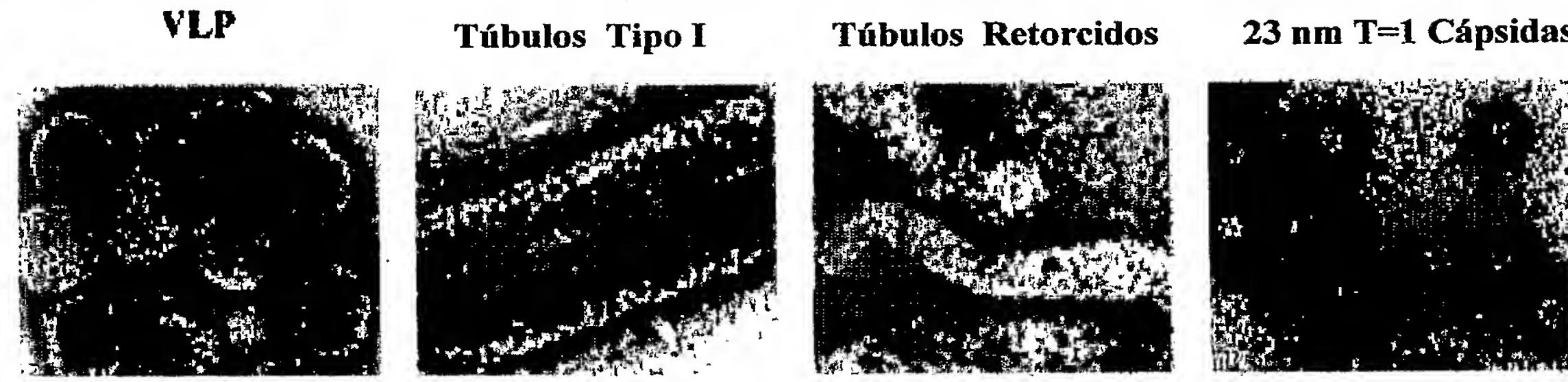
a*b***Construcción Génica****Estructura Resultante**

VLP (T=13) y Túbulos de Tipo I*

Túbulos de Tipo I †

Túbulos retorcidos‡

23 nm T= 1 Cápsidas

**Figura 1**

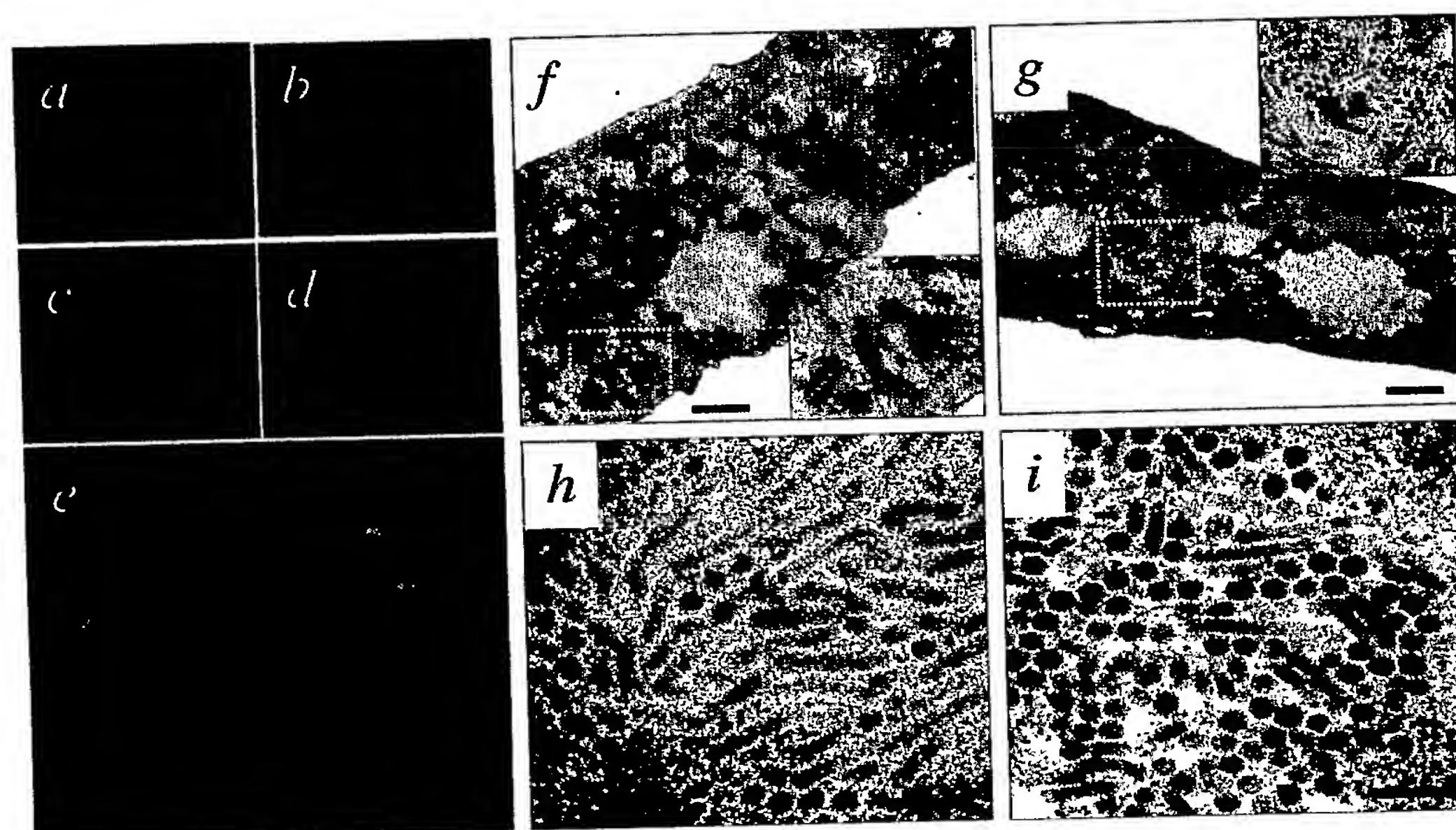


Figura 2

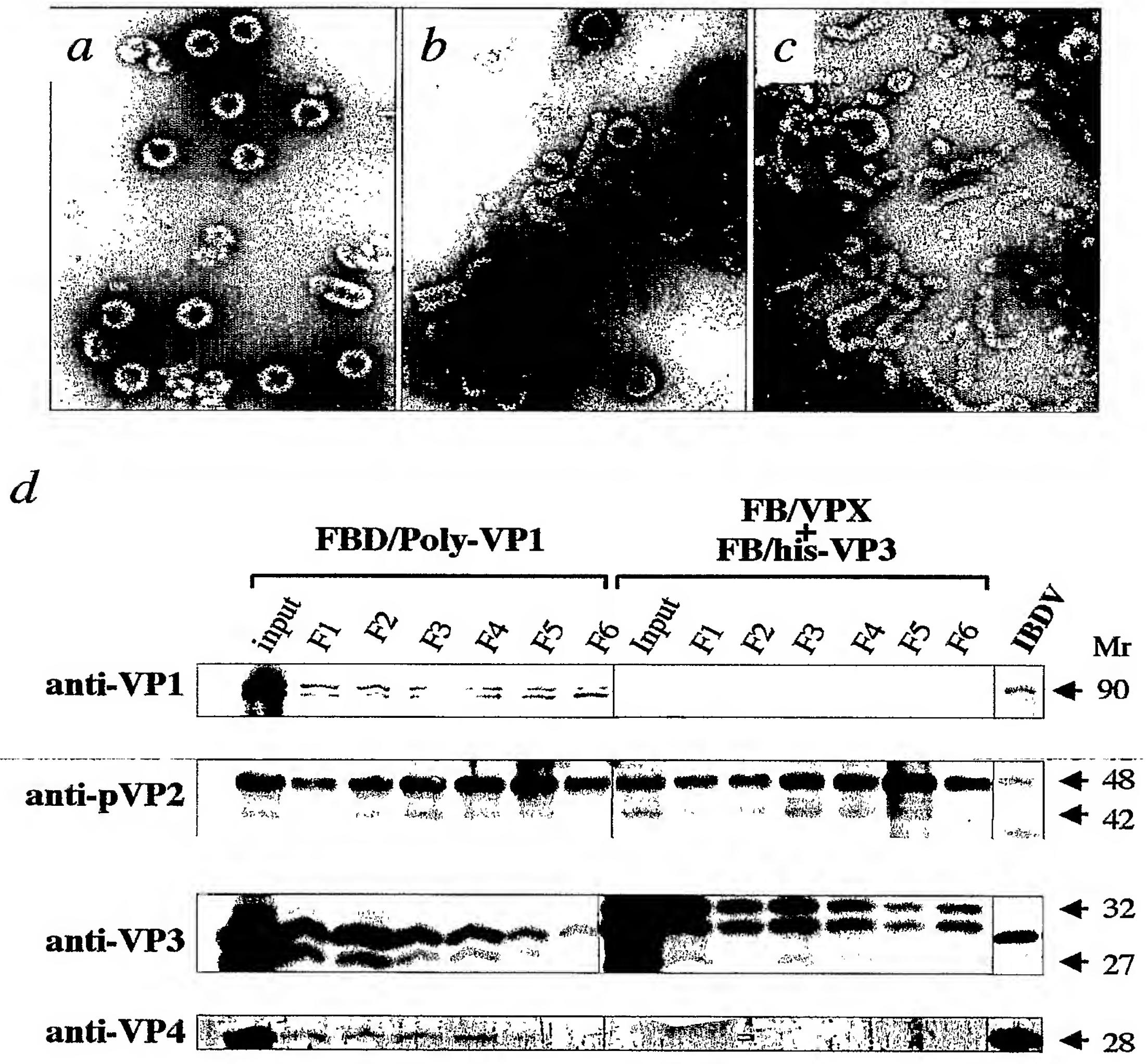


Figura 3

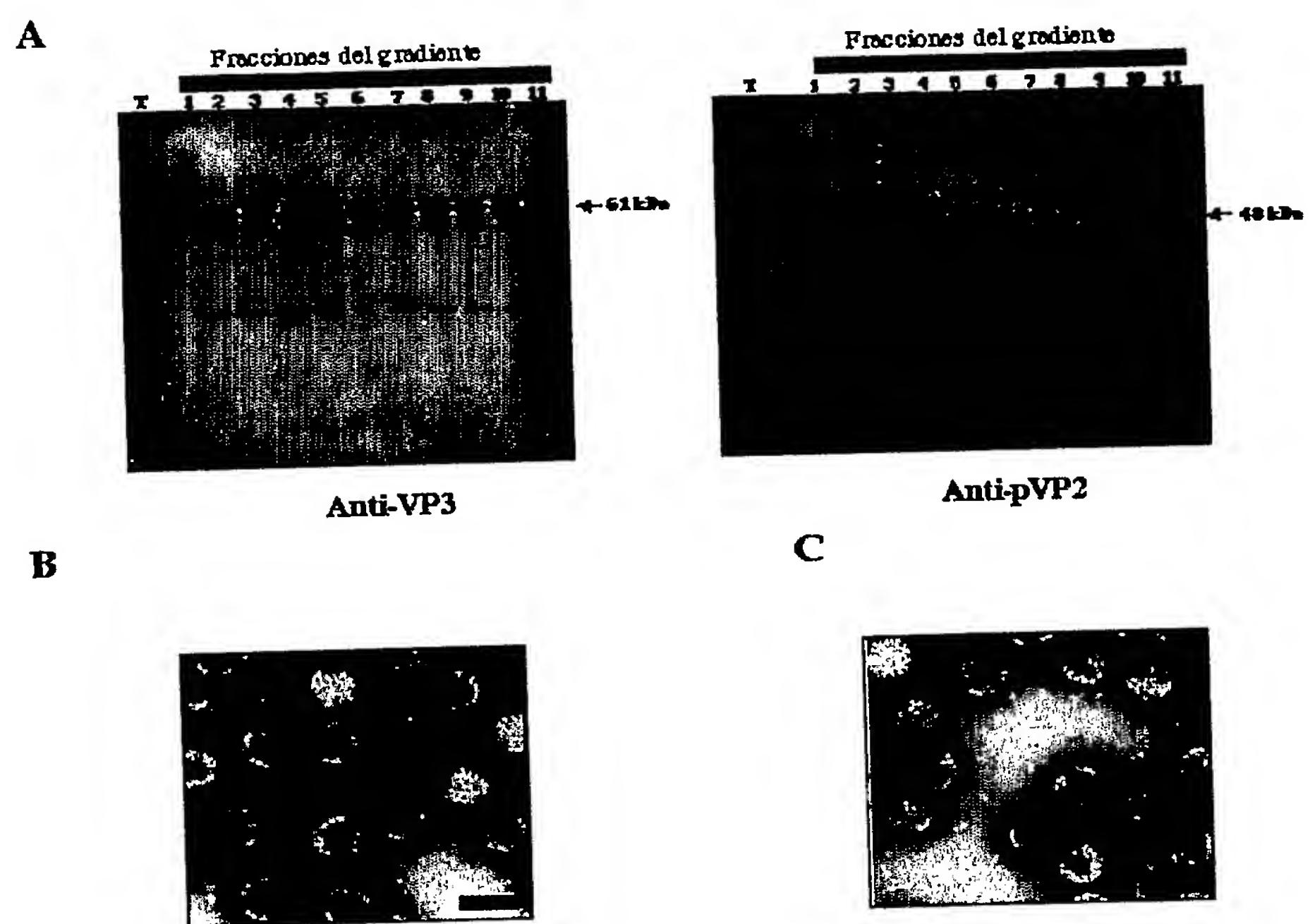


Figura 4

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

5 <110> BIONOSTRA, S.L.

10 <120> CÁPSIDAS VACÍAS (VLPs (-VP4)) DEL VIRUS CAUSANTE DE LA
ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU PROCEDIMIENTO
DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES

<130> VLPs (-VP4)

15 <160> 10

<170> PatentIn version 3.1

20 <210> 1

<211> 35

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Oligo I

30 <400> 1

gcgcaagatct atgacaaacc tgtcagatca aaccc

35

35 <210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Oligo II

<400> 2

45 gcgcaagctt aggcgagagt cagctgcctt atgc

34

<210> 3

<211> 7595

<212> DNA

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pFBD/pVP2-his-VP3

55 <220>

<221> promotor

<222> (157) .. (285)

<223> Promotor ppolh

55 <220>

<221> CDS

<222> (291) .. (1289)

<223> pVP2 ORF

<220>
<221> promotor
<222> (7443)..(7503)
<223> Promotor p10
5
<400> 3
gggtgatcaa gtcttcgtcg agtgattgta aataaaatgt aatttacagt atagtatttt 60
aattaatata caaatgattt gataataatt cttatttaac tataatatat tgtgttgggt 120
10
tgaattaaag gtccgtatac tccggaatat taatagatca tggagataat taaaatgata 180
accatctcgc aaataaaataa gtattttact gtttgcgtaa cagtttgta ataaaaaaac 240
15
ctataaatat tccggattat tcataaccgtc ccaccatcg ggcggatct atg aca 296
Met Thr
1
aac ctg tca gat caa acc cag cag att gtt ccg ttc ata cgg agc ctt 344
Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg Ser Leu
5 10 15
20
ctg atg cca aca acc gga ccg gcg tcc att ccg gac gac acc ctg gag 392
Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr Leu Glu
25 20 25 30
aag cac act ctc agg tca gag acc tcg acc tac aat ttg act gtg ggg 440
Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr Val Gly
35 35 40 45 50
30
gac aca ggg tca ggg cta att gtc ttt ttc cct gga ttc cct ggc tca 488
Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro Gly Ser
55 60 65
35
att gtg ggt gct cac tac aca ctg cag ggc aat ggg aac tac aag ttc 536
Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr Lys Phe
70 75 80
40
gat cag atg ctc ctg act gcc cag aac cta ccg gcc agt tac aac tac 584
Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr Asn Tyr
85 90 95
45
tgc agg cta gtg agt cggt ctc aca gtg agg tca agc aca ctt cct 632
Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr Leu Pro
100 105 110
50
ggc ggc gtt tat gca cta aac ggc acc ata aac gcc gtg acc ttc caa 680
Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr Phe Gln
115 120 125 130
55
gga agc ctg agt gaa ctg aca gat gtt agc tac aat ggg ttg atg tct 728
Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu Met Ser
135 140 145
55
gca aca gcc aac atc aac gac aaa att ggg aac gtc cta gta ggg gaa 776
Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val Gly Glu
150 155 160

	ggg gtc acc gtc ctc agc tta ccc aca tca tat gat ctt ggg tat gtg Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly Tyr Val 165 170 175	824
5	agg ctt ggt gac ccc att ccc gca ata ggg ctt gac cca aaa atg gta Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys Met Val 180 185 190	872
10	gcc aca tgt gac agc agt gac agg ccc aga gtc tac acc ata act gca Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile Thr Ala 195 200 205 210	920
15	gcc gat gat tac caa ttc tca tca cag tac caa cca ggt ggg gta aca Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly Val Thr 215 220 225	968
20	atc aca ctg ttc tca gcc aac att gat gcc atc aca agc ctc agc gtt Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu Ser Val 230 235 240	1016
	ggg gga gag ctc gtg ttt cga aca agc gtc cac ggc ctt gta ctg ggc Gly Gly Glu Leu Val Phe Arg Thr Ser Val His Gly Leu Val Leu Gly 245 250 255	1064
25	gcc acc atc tac ctc ata ggc ttt gat ggg aca acg gta atc acc agg Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile Thr Arg 260 265 270	1112
30	gct gtg gcc gca aac aat ggg ctg acg acc ggc acc gac aac ctt atg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn Leu Met 275 280 285 290	1160
35	cca ttc aat ctt gtg att cca aca aac gag ata acc cag cca atc aca Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro Ile Thr 295 300 305	1208
	tcc atc aaa ctg gag ata gtg acc tcc aaa agt ggt ggt cag gca ggg Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln Ala Gly 310 315 320	1256
40	gat cag atg tca tgg tcg gca aga ggg agc cta gcagtgcac tccatgggg Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu 325 330	1309
45	caactatcca gggccctcc gtcccgac gctagtggcc tacgaaagag tggcaacagg atccgtcggt acggtagtg gggtagcaa ctccgagctg atccccatc ctgaacttagc 1369	1429
50	aaagaacctg gttacagaat acggccgatt tgaccaggaa gccatgaact acacaaaatt gatactgagt gagagggacc gtcttggcat caagaccgtc tggccaaacaa gggagtacac 1489	1549
	tgacttttgt gaatacttca tggaggtggc cgacctcaac tctccctga agattgcagg	1609
55	agcattcggc ttcaaagaca taatccgggc cataaggagg atagctgtgc cggtggctc cacattgttc ccacactgccc ctccccatc ccatgcaatt gggaaaggtg tagactacct 1669	1729
60	gctggcgat gagggccagg cggcttcagg aactgctcga gccgcgtcag gaaaagcaag	1789

agctgcctca ggccgcataa ggcagctgac tctcgctaa gcttgcgag aagtactaga 1849
ggatcataat cagccataacc acattttag aggtttact tgcttaaaa aacctcccac 1909
5 acctccccct gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt tggtgttaac ttgtttattg 1969
cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 2029
tttcactgca ttctagttgt ggttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 2089
10 tctgatcact gcttgaggct aggagatccg aaccagataa gtgaaatcta gttccaaact 2149
atttgtcat ttttaatttt cgtattagct tacgacgcta cacccagttc ccatctattt 2209
15 tgtcactctt ccctaaataa tccttaaaaaa ctccatttc acccctccc gttccaaact 2269
atttgtccg cccacagcgg ggcattttc ttccctgttat gttttaatc aaacatcctg 2329
20 ccaactccat gtgacaaacc gtcatcttcg gctactttt ctctgtcaca gaatgaaaat 2389
tttctgtca tctttcggtt attaatgttt gtaattgact gaatatcaac gcttatttgc 2449
agcctgaatg gcgaatggga cgcgcctgt agcggcgcat taagcgcggc gggtgtggtg 2509
25 gttacgcgca gcgtgaccgc tacacttgcc agcgccctag cgcccgctcc ttccgtttc 2569
ttcccttcct ttctcgccac gttcgccggc tttccccgtc aagctctaaa tcgggggctc 2629
30 ccttagggt tccgatttag tgctttacgg cacctcgacc ccaaaaaact tgatttagggt 2689
gatggttcac gtagtgggcc atcgccctga tagacggttt ttccgccttt gacgttggag 2749
tccacgttct ttaatagtgg actcttgttc caaactggaa caacactcaa ccctatctcg 2809
35 gtctattctt ttgatttata agggatttg ccgatttcgg cctattggtt aaaaaatgag 2869
ctgatttaac aaaaatttaa cgcgaaattt aacaaaatat taacgtttac aatttcaggt 2929
40 ggcactttc gggaaatgt gcgcggacc cctattgtt tattttcta aatacattca 2989
aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg 3049
aagagtatga gtattcaaca ttccgtgtc gcccttattc ctttttgc ggcattttgc 3109
45 cttcctgttt ttgctcaccc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg 3169
ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagttt 3229
50 cgccccgaag aacgtttcc aatgatgagc actttaaag ttctgctatg tggcgccgta 3289
ttatcccgta ttgacgcccgg gcaagagcaa ctcggcgcc gcatacacta ttctcagaat 3349
gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctt cggatggcat gacagtaaga 3409
55 gaattatgca gtgctgccat aaccatgagt gataacactg cggccaactt acttctgaca 3469
acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct ttttgcaca acatggggga tcgttact 3529
60 cgccttgcgtc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc 3589

ccaagcgcgt tggcctcatg cttgaggaga ttgatgagcg cggtggcaat gccctgcctc 5449
 cggtgctcgc cggagactgc gagatcatag atatagatct cactacgcgg ctgctcaaac 5509
 5 ctgggcagaa cgtaagccgc gagagcgcca acaaccgctt cttggtcgaa ggcagcaagc 5569
 gcgatgaatg tcttactacg gagcaagtgc ccgaggtaat cgagtcgg ctgatgttgg 5629
 gagtaggtgg ctacgtctcc gaactcacga ccgaaaagat caagagcagc ccgcattggat 5689
 10 ttgacttgtt cagggccgag cctacatgtg cgaatgatgc ccatacttga gccacctaac 5749
 tttgttttag ggcgactgcc ctgctgcgt acaatgatgc tgctgcgtaa catcggttgc 5809
 15 gctccataac atcaaacatc gacccacggc gtaacgcgt tgctgcttgg atgcccggagg 5869
 catagactgt acaaaaaaac agtcataaca agccatgaaa accgcccactg cgccgttacc 5929
 20 accgctgcgt tcggtcaagg ttctggacca gttgcgtgag cgcatacgt acttgcatta 5989
 cagttacga accgaacagg cttatgtcaa ctgggttcgt gccttcatcc gttccacgg 6049
 tgtgcgtcac ccggcaacct tggcagcag cgaagtcgag gcatttctgt cctggctggc 6109
 25 gaacgagcgc aaggttcgg tctccacgca tcgtcaggca ttggcggcct tgctgttctt 6169
 ctacggcaag gtgctgtgca cggatctgcc ctggcttcag gagatcggtt gacctcgccc 6229
 gtcgcggcgc ttgcgggtgg tgctgacccc ggatgaagtg gttcgatcc tcggttttct 6289
 30 ggaaggcgag catcggttgc tcgcccagga ctctagctat agttcttagtg gttggcctac 6349
 gtacccgtag tggctatggc agggcttgcc gccccgacgt tggctgcgag ccctggcct 6409
 35 tcacccgaac ttgggggttg gggtgggaa aaggaagaaa cgcggcgta ttggtccaa 6469
 tggggtctcg gtggggtatac gacagagtgc cagccctggg accgaacccc gcgttatga 6529
 acaaacgacc caacacccgt gcgttttatt ctgtctttt attgccgtca tagcgcgggt 6589
 40 tccttcgggt attgtctcct tccgtgttgc agttgcctc ccccatctcc cggtaccgca 6649
 tgccctcgaga ctgcaggctc tagattcgaa agcggccgag actagtggc tcgtcgacgt 6709
 45 aggccttga attccggatc ctcactcaag gtcctcatca gagacggtcc tgatccagcg 6769
 gcccagccga ccaggggttc tctgtgttgg agcattgggt tttggcttgg gctttggtag 6829
 50 agcccgctg ggattgcgt gcttcatctc catcgacgtc aagagcagat ctttcatctg 6889
 ttcttggtt gggccacgtc catggttgtat ttcatagact ttggcaactt cgtctatgaa 6949
 agcttgggtt ggctctgcct gtcctggagc cccgtagatc gacgttagctg cccttaggt 7009
 55 ttgttcttct gatgccaacc ggctttctc tgcattgcacg tagtcttagat agtcctcggt 7069
 tgggtccgggt atttctcggtt tggcttgccatc gtactttacc tggcctggc ttggccctcg 7129
 gtgcccattt gatgctaccc attctgggttg tgcaaagtag atgcccatttgc tctccatctt 7189
 60

ctttgagatc cgtgtgtctt tttccctctg tgcttcctct ggtgtgggc cccgagcctc 7249
 cactccgtag cctgctgtcc cgtacttggc cctttgcac ttgctgcctg cttgtgggc 7309
 5 gtttgcaga aaatttcgca tccgatggc gttcggtcg ctgagtgcga agttggccat 7369
 gtcagtcaca atcccattct cttccagcca catgaacaca ctgagtgcag attgaaatag 7429
 10 tgggtccacg ttggctgctg cttccattgc tctgacggca ctctcgagtt cgggggtctc 7489
 tttgaactct gatgcagcca tggcgccctg aaaatacagg ttttcggtcg ttggatatc 7549
 gtaatcgtga tggtgatggt gatggtagta cgacatggtt tcggac 7595
 15
 <210> 4
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Plásmido pFBD/pVP2-his-VP3
 <400> 4
 25 Met Thr Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
 20 25 30
 30 Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
 35 40 45
 Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro
 35 50 55 60
 Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr
 65 70 75 80
 40 Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr
 85 90 95
 Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr
 100 105 110
 45 Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr
 115 120 125
 Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu
 50 130 135 140
 Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val
 145 150 155 160
 55 Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly
 165 170 175
 Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys
 180 185 190
 60

Met Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile
 195 200 205
 5 Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly
 210 215 220
 Val Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu
 225 230 235 240
 10 Ser Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Arg Thr Ser Val His Gly Leu Val
 245 250 255
 Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile
 260 265 270
 15 Thr Arg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn
 275 280 285
 20 Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro
 290 295 300
 Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln
 305 310 315 320
 25 Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu
 325 330

30 <210> 5
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Oligo III

40 <400> 5
 ggcgcagatct atgacaaaacc tgtcagatca aaccc 35

45 <210> 6
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Oligo IV

55 <400> 6
 gcgcaagctt agggcgaggt cagctgcctt atgc 34

60 <210> 7
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligo V

<400> 7
 gcgcaattc gatggcatca gagttcaaag aga 33

5 <210> 8
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligo VI

<400> 8
 cgccggatccc tcaaggcct catcagagac gg 32

15 <210> 9
 <211> 9600
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP

25 <220>
 <221> promotor
 <222> (5649) .. (5859)
 <223> Promotor GAL 1 (pVP2)

30 <220>
 <221> promotor
 <222> (7402) .. (8080)
 <223> Promotor GAL 2 (VP3-GFP)

35 <220>
 <221> CDS
 <222> (8086) .. (9597)
 <223> VP3-GFP ORF

40 <400> 9
 ggccgcacta gtatcgatgg attacaagga tgacgacgat aagatctgag ctcttaatta 60

acaattcttc gccagagggtt tggtaagtc tccaatcaag gttgtcggct tgtctacctt 120

45 gccagaaatt tacaaaaaga tggaaaaggg tcaaatacg ttgttgacac 180

ttctaaataa gcgaatttct tatgatttat gatTTTattt attaaataag ttataaaaaaa 240

50 aataagtgtatcacaaatttt aaagtgactc ttaggtttta aaacgaaaat tcttatttctt 300

gagtaactct ttcctgttagg tcaggttgct ttctcaggta tagcatgagg tcgctccat 360

tcagctgcattatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggTTTgcgtt ttggggcgctc 420

55 ttccgcgttcc tcgctcactg actcgctgct ctcggctgtt cggctgcggc gagcggatc 480

agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa 540

60 catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggtt 600

tttccatagg ctccggcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg 660
 gcgaaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgttccc cctggaagct ccctcggtcg 720
 5 ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gccttctcc cttcgaaag 780
 cgtggcgctt tctcatagct caagctgttag gtatctcagt tcggtgttagg tcgttcgctc 840
 caagctgggc tgtgtgcacg aaccccccgt tcagccgac cgctgcccct tatccggtaa 900
 10 ctatcgctt gagtccaacc cggttaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg 960
 taacaggatt agcagagcga ggtatgttagg cggtgctaca gagttcttga agtggtgcc 1020
 15 taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac 1080
 cttcgaaaaa agagttggta gctcttgcac accaccgctg gtagcgggtgg 1140
 20 ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt 1200
 gatctttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttgg 1260
 catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat gaagttttaa 1320
 25 atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga 1380
 ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcatccata gttgcctgac tccccgtcgt 1440
 30 gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg 1500
 agacccacgc tcaccggctc cagatttac agcaataaac cagccagccg gaagggccga 1560
 gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga 1620
 35 agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg 1680
 catcggttg tcacgctcgt cgtttggat ggcttcattc agctccgggtt cccaaacgatc 1740
 40 aaggcgagtt acatgatccc ccatgttgtg caaaaaagcg gttagtcct tcggcctcc 1800
 gatcggtgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg cagcactgca 1860
 taattctctt actgtcatgc catccgtaaat atgctttct gtgactgggt agtactcaac 1920
 45 caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttggccgg cgtcaatacg 1980
 ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgcac atcatggaa aacgttcttc 2040
 50 gggcgaaaaa ctctcaagga tcttaccgtt gttgagatcc agttcgatgt aacctactcg 2100
 tgcacccaaac tcatcttcag catctttac tttcaccaggc gtttctgggt gagcaaaaac 2160
 aggaaggcaa aatgccgcaa aaaaggaaat aagggcgaca cggaaatgtt gaataactcat 2220
 55 actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata 2280
 catatggaa tgtatggaa aaaataaaca aatagggtt ccgcgcacat ttccccgaaa 2340
 agtgcacccctt gaacgaagca tctgtgcttc attttggaa aaaaaatgc aacgcgagag 2400
 60

cgctaatttt tcaaacaag aatctgagct gcattttac agaacagaaa tgcaacgcga 2460
 aagcgctatt ttaccaacga agaatctgtg cttcattttt gtaaaacaaa aatgcaacgc 2520
 5 gagagcgcta attttcaaa caaagaatct gagctgcatt tttacagaac agaaatgcaa 2580
 cgcgagagcg ctatTTacc aacaaagaat ctatacttct ttttgttct acaaaaatgc 2640
 10 atcccggagag cgctatTTT ctaacaaagc atcttagatt actTTTTtc tccttgc 2700
 gctctataat gcagtctctt gataacttt tgcaactgt tagtccgttaag gttagaagaa 2760
 ggctactttg gtgtcttattt tctcttccat aaaaaaagcc tgactccact tcccgcgttt 2820
 15 actgattact agcgaagctg cgggtgcatt tttcaagat aaaggcatcc ccgattatat 2880
 tctataccga tgtggattgc gcatacttg tgaacagaaa gtgatagcgt tgatgattct 2940
 20 tcattggtca gaaaattatg aacggtttct tctatTTTgt ctctatatac tacgtatagg 3000
 aaatgtttac atttcgtat tgTTTcgat tcactctatg aatagttctt actacaattt 3060
 ttttgcctaa agagtaatac tagagataaa cataaaaaat gtagaggtcg agtttagatg 3120
 25 caagttcaag gagcggaaagg tggatggta gtttatatacg ggtatagca cagagatata 3180
 tagcaaagag atacTTTga gcaatgtttg tggaaagcgtt attcgcaata ttttagtagc 3240
 30 tcgttacagt ccggtggtt tttggTTTT tgaaagtgcg tcttcagagc gctttggtt 3300
 ttcaaaagcg ctctgaagtt cctatacttt ctagagaata ggaacttcgg aataggaact 3360
 tcaaagcggt tccgaaaacg agcgcttccg aaaatgcaac gcgagctgcg cacatacagc 3420
 35 -tcactgttca cgtcgcacct atatctgcgt gttgcctgta tatataatata catgagaaga 3480
 acggcatagt gcgtgtttat gcttaaatgc gtacttatat gcgtctattt atgttaggatg 3540
 aaaggtagtc tagtacctcc tgtgatatta tcccaattcca tgcgggtat cgtatgcttc 3600
 40 cttcagcact acccttttagc tgTTTtatat gctgccactc ctcaatttggc ttagtctcat 3660
 cttcaatgc tatcatttcc tttgatattt gatcatacta agaaaccatt attatcatga 3720
 45 cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga ggcctttcg tctcgcggt ttcgggtatg 3780
 acggtaaaaa cctctgacac atgcagctcc cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg 3840
 50 atgcggggag cagacaagcc cgtcaggcg cgtcagcggg tgggggggg tgcggggct 3900
 ggcttaacta tgcggcatca gagcagattt tactgagagt gcaccatacc acagctttc 3960
 aattcaatttcc atcatttttt ttttattttt ttttttgcatt tggTTTCTT tgaaatTTT 4020
 55 ttgattcggt aatctccgaa cagaaggaag aacgaaggaa ggagcacaga ctttagattgg 4080
 tataatatacg catatgttgtt gttgaagaaa catgaaatttgc cccagtttcc ttaacccaaac 4140
 60 tgcacagaac aaaaacctgc aggaaacgaa gataaatcat gtcgaaagct acatataagg 4200

aacgtgctgc tactcatcct agtcctgttg ctgccaaagct atttaatatac atgcacgaaa 4260
 agcaaacaaa cttgtgtgct tcattggatg ttcgtaccac caaggaatta ctggagttag 4320
 5 ttgaaggcatt aggtcccaaa atttgtttac taaaaacaca tgtggatatac ttgactgatt 4380
 tttccatgga gggcacagtt aagccgctaa aggattatac cgccaagtac aatttttac 4440
 10 tcttcgaaga cagaaaattt gctgacattt gtaatacagt caaattgcag tactctgcgg 4500
 gtgtatacag aatagcagaa tgggcagaca ttacgaatgc acacggtgtg gtggcccag 4560
 gtattgttag cggttgaag caggcggcag aagaagtaac aaaggaacct agaggcctt 4620
 15 tgatgttagc agaattgtca tgcaaggct ccctatctac tggagaatat actaaggta 4680
 ctgttgcacat tgcaagagc gacaaagatt ttgttatcggtt ctttattgct caaagagaca 4740
 20 tgggtgaaag agatgaaggt tacgatttgt tgattatgac acccggtgtg ggtttagatg 4800
 acaaggaga cgcattgggt caacagtata gaaccgtgga tgatgtggtc tctacaggat 4860
 ctgacattat tattgttggaa agaggactat ttgcaaaggaa aaggatgtc aaggttagagg 4920
 25 gtgaacgtta cagaaaagca ggctggaaag catatttgag aagatgcggc cagcaaaact 4980
 aaaaaactgt attataagta aatgcattgt tactaaactc acaaattaga gttcaattt 5040
 30 aattatatac gttattaccc tatgcggtgtt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa 5100
 taccgcacatca ggaaattgtt aacgttaata ttttgttaaa attcgcttta aattttgtt 5160
 aaatcagctc atttttaac caataggccg aaatcgccaa aatcccttat aaatcaaaag 5220
 35 aatagaccga gatagggttg agtgttgttc cagttggaa caagagtcca ctattaaaga 5280
 acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg 5340
 40 aaccatcacc ctaatcaagt ttttgggtt cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc 5400
 ctaaaggag cccccgattt agagcttgcg ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaaagg 5460
 aaggaaagaa agcgaaagga gcggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc 5520
 45 gcgttaaccac cacacccgac ggcgttaatg cggcgctaca gggcgctcg cgccattcgc 5580
 cattcaggct ggcacactgt tggaaaggc gatcggtgcg ggcctttcg ctattaeGCC 5640
 50 agctggatct tcgagcgtcc caaaaccttc tcaagcaagg tttcagtat aatgttacat 5700
 gcgtacacgc gtctgtacag aaaaaaaaaa aaaaattgaa atataaataa ctttcttaat 5760
 actaacataa ctataaaaaaa ataaataggg acctagactt caggttgtct aactcccttcc 5820
 55 ttttcggtta gagcggatct tagctagccg cggtagccaag cttaggcgag agtcagctgc 5880
 cttatgcggc ctgaggcagc tcttgcttt cctgacgcgg ctcgagcagt tcctgaagcg 5940
 60 gcctggccct catcgccccag caggtgtct acaccttccc caattgcattg ggcttagggaa 6000

gcggcagggtg ggaacaatgt ggagaccacc ggcacagcta tcctccttat ggcccggatt 6060
 atgtcttga agccgaatgc tcctgcaatc ttcaggggag agttgaggtc ggccacactcc 6120
 5 atgaagtatt cacgaaagtc agtgtactcc cttgttggcc agacggtctt gatgccaaga 6180
 cggtccctct cactcagtat caattttgtg tagttcatgg ctcctgggtc aaatcgcccg 6240
 tattctgtaa ccaggttctt tgctagttca ggatttggga tcagctcgaa gttgctcacc 6300
 10 ccagcgaccc taacgacgga tcctgttgc actcttcgt aggccactag cgtgacggga 6360
 cggagggccc ctggatagtt gccaccatgg atcgtcactg ctaggctccc tcttgccgac 6420
 15 catgacatct gatccccctgc ctgaccacca cttttggagg tcactatctc cagtttgatg 6480
 gatgtgattt gctgggttat ctcgtttgtt ggaatcacaa gattgaatgg cataaggttg 6540
 20 tcggtgccgg tcgtcagccc attgttgcg gccacagccc tggtgattac cggtgtccca 6600
 tcaaaggcta tgaggttagat ggtggcgccc agtacaaggc cgtggacgct tgttcgaaac 6660
 acgagctctc ccccaacgct gaggcttgc atggcatcaa tgttggctga gaacagtgtg 6720
 25 attgttaccc cacctgggtg gtactgtat gagaatttgtt aatcatcgcc tgcagttatg 6780
 gtgtagactc tgggcctgtc actgctgtca catgtggcta ccattttgg gtcaaggccct 6840
 attgcgggaa tgggttcacc aagcctcaca tacccaagat catatgatgt gggtaagctg 6900
 30 aggacggtga ccccttcccc tactaggacg ttcccaattt tgtcgttgat gttggctgtt 6960
 gcagacatca acccattgtt gctaacatct gtcagttcac tcaggcttcc ttggaaggc 7020
 35 acggcgtttta tggtgccgtt tagtgcataa acgccaccag-gaagtgtgct tgacctcact 7080
 gtgagactcc gactcaactag cctgcagtag ttgttaactgg ccggtaggtt ctggcagtc 7140
 40 aggagcatct gatcgaactt gtagttccca ttggcctgca gtgtgttagtg agcaccacaca 7200
 attgagccag ggaatccagg gaaaaagaca attagccctg accctgtgtc ccccacagtc 7260
 aaattgtagg tcgaggtctc tgacctgaga gtgtgcttct ccagggtgtc gtccggaatg 7320
 45 gacgcgggtc cgggtgttgg catcagaagg ctccgtatga acggaacaat ctgctgggtt 7380
 tgatctgaca ggtttgtcat agatccgggg tttttctcc ttgacgttaa agtataaggagg 7440
 50 tataattaaca attttttgtt gatactttta ttacatttga ataagaagta atacaaacccg 7500
 aaaatgttga aagtattagt taaagtggtt atgcagtttt tgcatttata tatctgttaa 7560
 tagatcaaaa atcatcgctt cgctgattaa ttacccaga aataaggcta aaaaactaat 7620
 55 cgcattatca tcctatggtt gttaatttga ttgcgttcatt tgaaggtttgc tggggccagg 7680
 ttactgccaa ttttcctct tcataaccat aaaagctagt attgttagaat ctttattgtt 7740
 60 cggagcagtgc cggcgcgagg cacatctgcg tttcaggaac gcgaccgggtg aagacgagga 7800

cgcacggagg agagtcttcc ttcggagggc tgtcacccgc tcggcggctt ctaatccgta 7860
 cttcaata gcaatgagca gttaagcgta ttactgaaag ttccaaagag aaggaaaaaa 7920
 5 taggctaaga taatggggct cttaacattt ccacaacata taagtaagat tagatatgga 7980
 tatgtataatg gatatgtata tggtggtaat gccatgtaat atgattatta aacttctttg 8040
 10 cgtccatcca aaaaaaaaaa 8097
 Met Ala Ala Ser
 1
 gag ttc aaa gag acc ccc gaa ctc gag agt gcc gtc aga gca atg gaa 8145
 Glu Phe Lys Glu Thr Pro Glu Leu Glu Ser Ala Val Arg Ala Met Glu
 5 10 15 20
 gca gca gcc aac gtg gac cca cta ttc caa tct gca ctc agt gtg ttc 8193
 Ala Ala Ala Asn Val Asp Pro Leu Phe Gln Ser Ala Leu Ser Val Phe
 20 25 30 35
 atg tgg ctg gaa gag aat ggg att gtg act gac atg gcc aac ttc gca 8241
 Met Trp Leu Glu Glu Asn Gly Ile Val Thr Asp Met Ala Asn Phe Ala
 40 45 50
 25 ctc agc gac ccg aac gcc cat cgg atg cga aat ttt ctt gca aac gca 8289
 Leu Ser Asp Pro Asn Ala His Arg Met Arg Asn Phe Leu Ala Asn Ala
 55 60 65
 30 cca caa gca ggc agc aag tcg caa agg gcc aag tac ggg aca gca ggc 8337
 Pro Gln Ala Gly Ser Lys Ser Gln Arg Ala Lys Tyr Gly Thr Ala Gly
 70 75 80
 tac gga gtg gag gct cgg ggc ccc aca cca gag gaa gca cag agg gaa 8385
 Tyr Gly Val Glu Ala Arg Gly Pro Thr Pro Glu Glu Ala Gln Arg Glu
 85 90 95 100
 35 aaa gac aca cgg atc tca aag aag atg gag acc atg ggc atc tac ttt 8433
 Lys Asp Thr Arg Ile Ser Lys Lys Met Glu Thr Met Gly Ile Tyr Phe
 105 110 115
 40 gca aca cca gaa tgg gta gca ctc aat ggg cac cga ggg cca agc cca 8481
 Ala Thr Pro Glu Trp Val Ala Leu Asn Gly His Arg Gly Pro Ser Pro
 120 125 130
 45 ggc cag gta aag tac tgg cag aac aaa cga gaa ata ccg gac cca aac 8529
 Gly Gln Val Lys Tyr Trp Gln Asn Lys Arg Glu Ile Pro Asp Pro Asn
 135 140 145
 50 gag gac tat cta gac tac gtg cat gca gag aag agc cgg ttg gca tca 8577
 Glu Asp Tyr Leu Asp Tyr Val His Ala Glu Lys Ser Arg Leu Ala Ser
 150 155 160
 55 gaa gaa caa atc cta agg gca gct acg tcg atc tac ggg gct cca gga 8625
 Glu Glu Gln Ile Leu Arg Ala Ala Thr Ser Ile Tyr Gly Ala Pro Gly
 165 170 175 180
 60 cag gca gag cca ccc caa gct ttc ata gac gaa gtt gcc aaa gtc tat 8673
 Gln Ala Glu Pro Pro Gln Ala Phe Ile Asp Glu Val Ala Lys Val Tyr
 185 190 195

	gaa atc aac cat gga cgt ggc cca aac caa gaa cag atg aaa gat ctg Glu Ile Asn His Gly Arg Gly Pro Asn Gln Glu Gln Met Lys Asp Leu 200 205 210	8721
5	ctc ttg act gcg atg gag atg aag cat cgc aat ccc agg cg ^g gct cta Leu Leu Thr Ala Met Glu Met Lys His Arg Asn Pro Arg Arg Ala Leu 215 220 225	8769
10	cca aag ccc aag cca aaa ccc aat gct cca aca cag aga ccc cct ggt Pro Lys Pro Lys Pro Lys Pro Asn Ala Pro Thr Gln Arg Pro Pro Gly 230 235 240	8817
15	cgg ctg ggc cgc tgg atc agg acc gtc tct gat gag gac ctt gag gga Arg Leu Gly Arg Trp Ile Arg Thr Val Ser Asp Glu Asp Leu Glu Gly 245 250 255 260	8865
20	tcc atc gcc acc atg gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg Ser Ile Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val 265 270 275	8913
25	gtg ccc atc ctg gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag ttc Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe 280 285 290	8961
30	agc gtg tcc ggc gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr 295 300 305	9009
35	ctg aag ttc atc tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr 310 315 320	9057
40	ctc gtg acc acc ctg acc tac ggc gtg cag tgc ttc agc cgc tac ccc Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro 325 330 335 340	9105
45	gac cac atg aag cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly 345 350 355	9153
50	tac gtc cag gag cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys 360 365 370	9201
55	acc cgc gcc gag gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile 375 380 385	9249
60	390 395 400	9297
55	aag ctg gag tac aac tac aac agc cac aac gtc tat atc atg gcc gac Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp 405 410 415 420	9345
60	425 430 435	9393

gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc acc ccc Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro 440 445 450	9441
5 atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc acc Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr 455 460 465	9489
10 cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val 470 475 480	9537
15 ctg ctg gag ttc gtg acc gcc ggg atc act ctc ggc atg gac gag Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu 485 490 495 500	9585
ctg tac aag taa agc Leu Tyr Lys	9600
20	
<210> 10	
<211> 503	
<212> PRT	
25 <213> Secuencia artificial	
30	
<220>	
<223> Plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP	
35 <400> 10	
Met Ala Ala Ser Glu Phe Lys Glu Thr Pro Glu Leu Glu Ser Ala Val 1 5 10 15	
40 Arg Ala Met Glu Ala Ala Asn Val Asp Pro Leu Phe Gln Ser Ala 20 25 30	
Leu Ser Val Phe Met Trp Leu Glu Glu Asn Gly Ile Val Thr Asp Met 35 40 45	
45 Ala Asn Phe Ala Leu Ser Asp Pro Asn Ala His Arg Met Arg Asn Phe 50 55 60	
Leu Ala Asn Ala Pro Gln Ala Gly Ser Lys Ser Gln Arg Ala Lys Tyr 65 70 75 80	
Gly Thr Ala Gly Tyr Gly Val Glu Ala Arg Gly Pro Thr Pro Glu Glu 85 90 95	
50 Ala Gln Arg Glu Lys Asp Thr Arg Ile Ser Lys Lys Met Glu Thr Met 100 105 110	
55 Gly Ile Tyr Phe Ala Thr Pro Glu Trp Val Ala Leu Asn Gly His Arg 115 120 125	
Gly Pro Ser Pro Gly Gln Val Lys Tyr Trp Gln Asn Lys Arg Glu Ile 130 135 140	
60 Pro Asp Pro Asn Glu Asp Tyr Leu Asp Tyr Val His Ala Glu Lys Ser 145 150 155 160	

	Arg Leu Ala Ser Glu Glu Gln Ile Leu Arg Ala Ala Thr Ser Ile Tyr			
	165	170	175	
5	Gly Ala Pro Gly Gln Ala Glu Pro Pro Gln Ala Phe Ile Asp Glu Val			
	180	185	190	
	Ala Lys Val Tyr Glu Ile Asn His Gly Arg Gly Pro Asn Gln Glu Gln			
10	195	200	205	
	Met Lys Asp Leu Leu Leu Thr Ala Met Glu Met Lys His Arg Asn Pro			
	210	215	220	
15	Arg Arg Ala Leu Pro Lys Pro Lys Pro Lys Pro Asn Ala Pro Thr Gln			
	225	230	235	240
	Arg Pro Pro Gly Arg Leu Gly Arg Trp Ile Arg Thr Val Ser Asp Glu			
	245	250	255	
20	Asp Leu Glu Gly Ser Ile Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu			
	260	265	270	
	Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn			
25	275	280	285	
	Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr			
	290	295	300	
30	Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val			
	305	310	315	320
	Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe			
	325	330	335	
35	Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala			
	340	345	350	
	Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp			
40	355	360	365	
	Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu			
	370	375	380	
45	Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn			
	385	390	395	400
	Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr			
	405	410	415	
50	Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile			
	420	425	430	
	Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln			
55	435	440	445	
	Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His			
	450	455	460	
60	Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg			
	465	470	475	480

Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu
485 490 495

5 Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
500

